

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de nistatina para
uso en candidiasis oral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos Benavent Núñez

Director

Santiago Torrado Durán

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de
nistatina para uso en candidiasis oral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos Benavent Núñez

DIRECTOR:

Santiago Torrado Durán

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de
nistatina para uso en candidiasis oral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos Benavent Núñez

DIRECTOR:

Santiago Torrado Durán

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. CARLOS BENAVENT NÚÑEZ estudiante en el Programa de Doctorado FARMACIA de la Facultad de FARMACIA de la Universidad Complutense de Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

DESARROLLO GALÉNICO DE NUEVAS FORMULACIONES DE NISTATINA PARA USO EN CANDIDIASIS ORAL

y dirigida por: SANTIAGO TORRADO DURÁN

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 03 de JULIO de 20 19

Fdo.: CARLOS BENAVENT NÚÑEZ

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser
insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del
título de Doctor.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a quien no puedo dejar de agradecer su esfuerzo, ayuda, disposición y auténtica calidad profesional y humana que me han llevado a concluir esta Tesis Doctoral. A todos ellos, siempre os tendré en mi recuerdo y por ello os doy mi más sincero agradecimiento:

1- En primer lugar, a la Dirección del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Farmacia de UCM, por haberme acogido en su seno, permitirme crecer y aprender como alumno de Master y Doctorado y haber podido utilizar instalaciones, material y equipos sin impedimento.

2- A mi director de Tesis, Dr. Santiago Torrado Durán, ya que, sin su inestimable ayuda, su capacidad motivadora, su visión galénica y su dedicación al proyecto, no habría sido posible la presentación de este trabajo. Nos costó creérmolo, pero, tras un gran número de horas de experimentación, al ordenador y al teléfono hemos podido concluirlo. Mi evolución y crecimiento como investigador han sido llevados de la mano por ti, Santiago; siempre te estaré agradecido y nunca lo voy a olvidar.

3- Al equipo decanal de la Facultad de Farmacia de la UCM, la conclusión de esta Tesis Doctoral pone el broche a mi desarrollo profesional en esta casa tras 15 años en la misma. Gracias por hacerme sentir que la facultad siempre ha sido, es y será mi casa.

4- A todos mis compañeros de departamento, muchas horas compartiendo laboratorio, balanza de precisión, cafetería o prácticas. Quiero mencionar especialmente a Loli, Helga, Carmen, Claudia, Esther y Teresa. Siempre me he sentido apoyado y me habéis ayudado a resolver dudas, tomar decisiones y disipar incertidumbres que me han hecho terminar este trabajo. Gracias de corazón.

5- Un agradecimiento especial a los compañeros que me ayudasteis con la determinación final de nistatina en la cavidad bucal, estoy seguro que siempre recordareis mis formulaciones de nistatina.

6- A Paloma Moya, por haberme permitido la realización de una estancia científica en el servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Virgen de la Salud de Toledo. Gracias por hacerme descubrir la investigación a nivel hospitalario.

7- A todo mi equipo de Farmacia Valdela Fuentes: Susana, Inés, Patricia, Marta y Loly, que durante todo este tiempo han colaborado cubriendo mis turnos y facilitando mis escapadas a la “facul” para completar el trabajo experimental.

8- A mi familia, por creer en mí en todo momento: a mis hermanos, Diego y María, por transmitirme su vitalidad y energía; a mi padre, Carlos, por haberme transmitido profesionalidad farmacéutica y responsabilidad, y muy especialmente a mi madre, Carmen: sin tu firmeza y voluntad, buena madre, nunca habría llegado a optar al título de Doctor. Junto a papá me has enseñado los valores de la constancia, el esfuerzo, la dedicación y el trabajo bien hecho, que siempre intento poner en práctica, y que termina (con un punto y seguido) con esta tesis doctoral. No se puede poner en unas líneas lo agradecido que os estoy por la educación y el cariño que me habéis dado y me seguís dando día a día. Esta tesis es un triunfo de la familia.

9- A Cris, por su paciencia, cariño y comprensión durante estos dos últimos años; por saber llevar mis estreses, mis ansiedades y esos fines de semana intensivos de facultad; y por su amor y optimismo que me llevan siempre a mirar hacia delante. Poco a poco, todo llega.

A María, Diego, mi padre y mi madre, por saber llevarme a hombros cuando más duro era el camino y hacerme sentir vuestro calor y cariño en todo momento. Os quiero.

A mis abuelos, Jacinto e Isacia, y a mi abuela Ana,
porque espero, que allá dónde estéis, os pueda hacer sentir orgullosos.

A Cris, porque todo proyecto debe empezar terminando los anteriores. Te quiero.

DESARROLLO GALÉNICO DE NUEVAS FORMULACIONES DE NISTATINA PARA USO EN CANDIDIASIS ORAL

PRESENTACIÓN

La nistatina es un principio activo con un extenso recorrido en el tratamiento de infecciones fúngicas, puesto que su descubrimiento se remonta a mediados del siglo XX (Chemical Heritage Foundation, 2016). De eficacia antifúngica reconocida y amplio uso, este polieno se ha visto relegado a un segundo plano tras el hallazgo y el desarrollo de la investigación de otro compuesto de la misma familia, Anfotericina B, con utilidad y aplicación en terapia sistémica (Lorenzo, P. et al, 2012). Nistatina no puede emplearse en perfusión intramuscular ni intravenosa debido a la toxicidad intrínseca que presenta, por lo que su uso principal se centra en el tratamiento de micosis superficiales de piel y de mucosas, debido a su escasa penetración por la piel (Thomson/Micromedex., 2006).

La falta de penetración por la piel y la escasa absorción sistémica por vía oral, consecuencia directa de su baja solubilidad acuosa (Remington, JP. y Gennaro, AR., 2000), hacen que sea un fármaco con un perfil de seguridad muy elevado y de gran utilidad en el abordaje de micosis superficiales. Sin embargo, este principio activo sólo se presenta en 4 medicamentos autorizados en el mercado farmacéutico español: 3 de ellos son cremas de uso tópico en combinación con corticoides y antibióticos, y sólo existe una formulación utilizada para el tratamiento de mucositis orales por hongos, Mycostatin®. Fue gracias a este medicamento comercializado por lo que se despertó el interés inicial que ha concluido en esta tesis doctoral: existe una demanda creciente de este tratamiento en oficina de farmacia, como consecuencia de la aparición de candidiasis orofaríngea en pacientes inmunodeprimidos o en tratamiento oncológico, en pacientes usuarios de inhaladores con corticoide, tras tratamientos antibacterianos de amplio espectro... El problema que presenta Mycostatin® es su baja estabilidad, ya que según especifica el fabricante, Bristol Myers Squibb, debe desecharse después de 7 días tras su apertura. Como comprobé durante mi estancia científica en el hospital Virgen de la Salud de Toledo, hay un gran número de dosis que se desechan con motivo de esta baja estabilidad. Así, la mejora de la estabilidad de la suspensión fue el motivo inicial que nos llevó a plantear este trabajo, basándonos en trabajos previos de estabilización mediante micelas (Mobasheri, M. et al, 2015) o con la elaboración de una dispersión sólida con lactosa y goma xantán (Arch Sakeer, K. et al, 2010).

Sin embargo, también planteamos la eficacia de nistatina en la prevención de la formación de biopelículas sobre catéteres o dispositivos de uso clínico en pacientes intubados. Trabajos previos (Cruciani, M. et al, 2005) nos hicieron descubrir la utilidad

DESARROLLO GALÉNICO DE NUEVAS FORMULACIONES DE NISTATINA PARA USO EN CANDIDIASIS ORAL

de nistatina como abordaje preventivo de la formación de biopelículas fúngicas por *Candida albicans*. De hecho, estos trabajos presentan a nuestro fármaco como un modelo de eficacia y bajo coste, al compararlo con anfotericina B, frente al cual, además, han aparecido resistencias (Boucherit-Atmani, Z. et al, 2011). Por ello, nistatina es el fármaco de elección en muchas unidades de cuidados intensivos de distintos hospitales españoles, como prevención en la formación de biopelículas.

Con estas dos premisas iniciales, realizamos el desarrollo de dos formulaciones: un sistema micelar con desoxicolato de sodio, tensoactivo que también se ha utilizado para estabilizar y potenciar la eficacia de anfotericina B (Gangadhar, KN. et al, 2014); y una dispersión sólida con un excipiente inerte, versátil y de fácil manejo, como son las maltodextrinas. Durante todo el periodo de investigación en el Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, hemos completado el diseño de la formulación mediante un abordaje fármaco-tecnológico, utilizando técnicas como la microscopía electrónica de barrido, la calorimetría diferencial de barrido, la difracción de rayos X y estudios *in vitro* de cesión. Para los ensayos de actividad microbiológica se ha utilizado una cepa específica de *Candida albicans*, cedida por el Departamento de Microbiología de la facultad de Farmacia de la UCM. La colaboración entre ambos departamentos en la búsqueda de tratamientos antifúngicos que presenten beneficios o ventajas es una constante en distintos proyectos de investigación. Por último, decidimos completar el trabajo de caracterización con un ensayo en voluntarios sanos, para determinar la permanencia del fármaco en la superficie mucosa. Con estos datos, queremos dar relevancia real de uso ante los problemas de estabilidad que presenta Mycostatin[®].

Aunque el trabajo de esta tesis doctoral se presenta ante comisión de Doctorado para su defensa, creo firmemente que la línea de investigación de nistatina debe continuar investigándose y ensayándose sola o en asociaciones con pre y probióticos para mejorar el perfil de estabilidad y eficacia de este fármaco.

ÍNDICE

INDICE

	Pág.
RESUMEN.....	21
Resumen.....	23
Summary.....	27
I. INTRODUCCIÓN.....	31
II. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.....	39
2.1. Objetivos.....	41
2.2 Planteamiento.....	42
III. DESARROLLO TEÓRICO.....	43
3.1 Nistatina.....	45
3.1.1 Descripción.....	45
3.1.2 Estructura química.....	46
3.1.3 Mecanismo de acción.....	46
3.1.4 Farmacocinética.....	47
3.1.5 Solubilidad.....	48
3.1.6 Espectro antimicrobiano.....	48
3.1.7 Indicaciones.....	49
3.1.8 Posología.....	50
3.1.9 Especificaciones de farmacopea.....	50
3.1.10 Formulaciones.....	51
3.1.11 Interacciones.....	52
3.1.12 Reacciones adversas y sobredosis.....	52
3.2 Infecciones fúngicas.....	53

3.2.1 Etiología.....	53
3.2.2 Género <i>Candida</i>	53
3.2.2.1 <i>Candida albicans</i>	56
3.2.2.2 Candidiasis orofaríngea.....	57
3.2.3 Tratamiento de infecciones fúngicas.....	58
3.2.4 Biopelículas.....	58
IV. SISTEMAS MICELARES DE NISTATINA.....	65
4.1 Introducción.....	67
4.2 Material y métodos.....	70
4.2.1 Materiales.....	70
4.2.2 Aparatos y equipos.....	70
4.2.3 Diseño de la formulación.....	71
4.2.3.1 Desoxicolato de sodio.....	71
4.2.3.2 Labrasol.....	73
4.2.4 Método estadístico.....	74
4.3 Estudio de preformulación.....	74
4.3.1 Procedimiento general.....	74
4.3.2 Proporción de tensoactivos.....	74
4.3.3 Determinación del tamaño de partícula.....	75
4.3.4 Microscopía electrónica de transmisión.....	77
4.3.5 Ensayo <i>in vitro</i> de actividad antifúngica.....	79
4.3.5.1 Procedimiento.....	79
4.4 Ensayos de caracterización farmacotécnicos.....	81
4.4.1 Aspecto.....	81

4.4.2 Microscopía electrónica de barrido.....	82
4.4.3 Calorimetría diferencial de barrido.....	84
4.4.4 Difracción de rayos X	86
4.5 Ensayos microbiológicos.....	88
4.5.1 Ensayo <i>in vitro</i> de actividad antifúngica.....	88
4.5.2 Actividad preventiva de formación de biopelículas.....	89
4.5.2.1 Formacion de la biopelícula.....	90
4.5.2.2 Ensayo <i>in vitro</i> de prevención de formación de biopelículas.....	92
4.6 Discusión parcial.....	93
V. DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA.....	95
5.1 Introducción.....	97
5.2 Material y métodos.....	102
5.2.1 Materiales.....	102
5.2.2 Aparatos y equipos.....	103
5.2.3 Diseño de la formulación.....	104
5.2.3.1 Maltodextrina.....	104
5.2.3.2 Elaboración de la formulación.....	106
5.2.3.2a Procedimiento general de elaboración de dispersión sólida por evaporación del disolvente.....	106
5.2.3.2b Disolución de nistatina en Dimetilacetamida.....	107
5.2.3.2c Cálculo de la proporción nistatina: maltodextrina.....	108
5.2.3.2d Etapa de evaporación del disolvente.....	109

5.2.4 Procedimiento final de obtención de dispersión sólida.....	110
5.2.5 Método estadístico.....	111
5.3 Ensayos de caracterización farmacotécnicos.....	111
5.3.1 Aspecto.....	112
5.3.2 Microscopía electrónica de barrido.....	113
5.3.3 Calorimetría diferencial de barrido.....	119
5.3.4 Difracción de rayos X	121
5.4 Ensayos microbiológicos.....	123
5.4.1 Ensayo <i>in vitro</i> de actividad antifúngica.....	123
5.4.2 Ensayo <i>in vitro</i> de prevención de la formación de biopelículas...	124
5.5 Ensayo <i>in vitro</i> de cesión en aparato de disolución.....	126
5.5.1 Desarrollo del ensayo de cesión en aparato de disolución.....	126
5.5.1.1 Carboximetilcelulosa sódica.....	127
5.5.2 Procedimiento general de preparación de la formulación para el estudio de cesión.....	128
5.5.3 Procedimiento para cesión en aparato de disolución.....	129
5.5.4 Análisis de nistatina por espectrofotometría UV/Vis.....	130
5.5.4.1 Selección de la longitud de onda.....	130
5.5.4.2 Obtención de las muestras.....	131
5.5.4.3 Obtención de la recta de calibrado.....	132
5.5.4.4 Resultados.....	132
5.6 Ensayo <i>in vivo</i> de cesión de nistatina en cavidad oral.....	137
5.6.1 Desarrollo del ensayo.....	137

5.6.2 Resultados.....	138
5.6.2.1 Caracteres organolépticos.....	138
5.6.2.2 Nistatina eliminada y retenida en la zona de acción.....	139
5.6.3 Correlación entre los resultados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	146
5.7 Discusión parcial.....	148
 VI. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SISTEMAS MICELARES Y DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA.....	 151
6.1 Aspecto y estabilidad.....	153
6.2 Ensayos de caracterización fármaco-tecnológicos.....	156
6.3 Ensayos microbiológicos.....	157
6.3.1 Ensayo <i>in vitro</i> de actividad antifúngica.....	157
VII. DISCUSIÓN FINAL.....	161
VIII. CONCLUSIONES.....	169
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	173
X. ANEXOS.....	197

RESUMEN

RESUMEN

Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de nistatina para uso en candidiasis oralIntroducción y objetivos:

La infección de la mucosa oral por *Candida albicans* es una patología creciente a nivel mundial debido al gran número de pacientes inmunodeprimidos, hospitalizados de larga duración o que requieren dispositivos de uso clínico. Aunque en pacientes sanos, estas infecciones suelen ser autolimitantes, en pacientes con el sistema inmune comprometido pueden llegar a constituir un grave problema de salud debido a la capacidad de desarrollar resistencias, la dificultad en el manejo de la infección y la formación de biopelículas por parte del hongo, que impiden la penetración del compuesto antifúngico. De hecho, estas biopelículas son un factor de mal pronóstico en enfermos intubados o cateterizados. Nistatina, un antifúngico polieno muy conocido, con un adecuado perfil de actividad antifúngica y asequible económicamente ha demostrado tener capacidad inhibitoria del desarrollo de estas biopelículas y puede constituir una excelente elección como tratamiento de la candidiasis oral. Sin embargo, su baja solubilidad acuosa, la reducida estabilidad que presenta en suspensión y la tendencia a la agregación y formación de compuestos cristalinos hacen que su uso se vea limitado. Así, los objetivos y el planteamiento para la realización de esta tesis doctoral serían los siguientes:

- 1- Desarrollo de una formulación de nistatina que permita el tratamiento de la candidiasis orofaríngea y la inhibición de la formación de biopelículas fúngicas sobre catéteres e instrumentos de intubación, aplicando estrategias de solubilización mediante micelas con tensoactivos o la elaboración de dispersiones sólidas.
- 2- Optimización de mejoras en la solubilidad y en la tendencia a la agregación de la nistatina, con el fin de aumentar la eficacia en el tratamiento de infecciones fúngicas y que pueda ser una alternativa útil como tratamiento y profilaxis de la formación de biopelículas producidas por *Candida albicans*.

Síntesis y resultados:

Tras un estudio de preformulación, en el que se evaluaron el tamaño de partícula de nistatina y la actividad antifúngica, de sistemas micelares con un tensoactivo no iónico (labrasol) y con otro aniónico (desoxicolato de sodio), se realizaron los ensayos

farmacotécnicos de los sistemas micelares con desoxicolato de sodio en proporción 1:0,8, ya que presentaba mejores propiedades. Así, mediante técnicas analíticas de caracterización fármacotécnica, como microscopía electrónica de barrido, calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X, se evidenció la reducción de la cristalinidad y la agregación de nistatina, lo que se tradujo en un importante aumento de la actividad antifúngica y preventiva de la formación de biopelículas.

En el desarrollo de la dispersión sólida, se utilizaron maltodextrinas como excipiente debido a su carácter inerte, versatilidad, fácil manejo y excelentes propiedades hidrosolubles, en proporción 1:6 de nistatina: maltodextrina. Los ensayos de caracterización de las dispersiones sólidas, con las mismas técnicas analíticas, determinaron la formación de una matriz polimérica de excipiente capaz de englobar en su interior los cristales de nistatina, originando un importante descenso de la cristalinidad de la formulación y adquiriendo una estructura prácticamente amorfa. Esta modificación de las características se tradujo en una mejora significativa de la actividad antifúngica y de la acción preventiva de formación de biopelículas. Por último, se realizó un ensayo de cesión en aparato de disolución con estas dispersiones sólidas, con el fin de calcular la cantidad de nistatina retenida en una celda de cesión, y un ensayo *in vivo* mediante enjuagues en voluntarios sanos con geles formulados con la dispersión sólida, para valorar la cantidad de nistatina retenida en la cavidad oral. Aunque los resultados fueron notablemente satisfactorios para las dispersiones sólidas, no fue posible realizar la correlación entre estos ensayos.

Tanto los sistemas micelares como las dispersiones sólidas obtuvieron resultados positivos en todos los ensayos realizados; sin embargo, estas últimas mostraron un perfil mucho más idóneo al presentar mayor significancia en las diferencias. El estudio comparativo de ambas formulaciones puso de relieve estos datos.

Conclusiones:

Las conclusiones de este trabajo de tesis doctoral se resumen en: la infrautilización de la nistatina como principio activo para el tratamiento de infecciones fúngicas de la cavidad oral por los problemas fármacotécnicos que presenta; el desoxicolato de sodio permite obtener sistemas micelares con nistatina en los que existe una población de partículas con un tamaño menor y más homogéneo (90% de la población menor de 200 nm), con baja tendencia a la aglomeración y cristalinidad reducida, que se traduce en un aumento de la actividad antifúngica y una reducción de la

adhesión y formación de biopelículas del 40%; el desarrollo de una dispersión sólida con maltodextrinas permite obtener una estructura prácticamente amorfa y con una cristalinidad muy baja, mejorándose la palatabilidad en la administración a pacientes, alcanzando un nivel óptimo de actividad antifúngica, con una reducción de la adhesión y la formación de biopelículas por encima del 83%; por último, los estudios de cesión a partir de geles de dispersión sólida mostraron que no se forman agregados durante la cesión, lo que permite alcanzar concentraciones inhibitorias adecuadas en la cavidad oral. Se necesita un desarrollo más prolongado y nuevas investigaciones para poder correlacionar los ensayos *in vitro* con los resultados *in vivo*. En futuros estudios, debería valorarse la combinación de estas formulaciones de nistatina con probióticos y prebióticos, con el fin de repoblar la microbiota orofaríngea.

SUMMARY

Pharmacotechnical development of new formulations of nystatin for use in oral candidiasisIntroduction and objectives:

The infection of the oral mucosa by *Candida albicans* is a growing pathology worldwide due to the large number of immunosuppressed patients, long-term hospitalizations or patients requiring clinical devices. Although in healthy patients, these infections are usually self-limiting, in patients with compromised immune system can become a serious problem because of the ability to develop resistances, the difficulty in handling the infection and the formation of biofilms by the fungus, which prevent the penetration of the antifungal compound. In fact, these biofilms are a factor of poor prognosis in intubated or catheterized patients. Nystatin, a well-known polyene antifungal, with an adequate profile of antifungal activity and economically available, has an inhibitory effect for the development of these biofilms and can be an excellent choice as a treatment for oral candidiasis. However, its low solubility, inadequate stability in suspension and tendency to aggregation and formation of crystalline compounds, avoid a more significant use. Therefore, the objectives and the approach for the realization of this doctoral thesis would be the following:

1- Development of a formulation of nystatin to treat oral candidiasis and to inhibit the formation of fungal biofilms on catheters and intubation instruments. Strategies such as solubilization by micelles with surfactants and the formation of solids dispersions will be carried out.

2- Optimization of improvements in the solubility and aggregation state of nystatin, in order to increase its effectiveness in the treatment of fungal infections. It may be a useful alternative as the treatment and prophylaxis of the formation of biofilms produced by *Candida albicans*.

Investigations and results:

As surfactants are compounds that stabilize suspensions of poorly water-soluble drugs by the formation of micelles, a preformulation study evaluated nystatin particle size and antifungal activity of micellar systems with a nonionic surfactant (labrasol) and anionic surfactant (sodium deoxycholate). Pharmacotechnical tests were carried out over micellar systems with sodium deoxycholate in a 1: 0.8 ratio, as it showed better properties. Thus, by analytical techniques of pharmacotechnical

characterization, such as scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry and X-ray powder diffraction, reduction of crystallinity and nystatin aggregation were evidenced. These facts explained the important increase in antifungal activity and preventive action of biofilm formation.

On the other hand, the development of solid dispersions was carried out using maltodextrins in a 1: 6 ratio (nystatin:maltodextrin). This excipient showed an inert character, versatility, easy handling and excellent water-soluble properties. The same analytical techniques were used in solid dispersions characterization tests. The formation of an excipient polymer matrix capable of enclosing nystatin crystals was determined. This matrix changed nystatin structure, showing an amorphous profile and significantly decreased the crystallinity of the formulation. These facts resulted in a significant improvement of the antifungal activity and the preventive action of biofilm formation. Finally, an assignment test was carried out in dissolution apparatus with solid dispersions, in order to calculate the amount of retained nystatin in the transfer cell; and an *in vivo* test by rinsing in healthy volunteers with gels formulated with the solid dispersion, to assess the adhesion of nystatin in the oral cavity. Although the results were remarkably satisfactory for solid dispersions, it was not possible to perform a correlation between *in vitro* and *in vivo* assays.

Both micellar systems and solid dispersions showed positive results in all tests carried out. However, solid dispersions showed a much better profile as they presented greater significance in differences. The comparative study of both formulations highlighted these data.

Conclusions:

The conclusions of this work are here summarized. Pharmacotechnical problems of nystatin explain the lack of use of nystatin as an active principle for the treatment of fungal infections of the oral cavity. Sodium deoxycholate' micellar systems with nystatin showed a population of particles with a smaller and more homogeneous size (90% of the population smaller than 200 nm), a low tendency to agglomeration and reduced crystallinity. These facts explain the increase of antifungal activity and the reduction of the adhesion and formation of biofilms of 40%. The development of a solid dispersion with maltodextrins allows obtaining a practically amorphous structure with very low crystallinity. These changes in structure improved the palatability in oral administration to patients, reaching an optimal level of antifungal activity, with a

reduction of the adhesion and the formation of biofilms by over 83%. The studies of assignment from solid dispersion's gels showed that no nystatin aggregates are formed during the process, which allows reaching adequate inhibitory concentrations in the oral cavity. Long-term development and new research are needed to correlate *in vitro* tests with *in vivo* results. Further studies should evaluate the combination of these formulations of nystatin with probiotics and prebiotics in order to balance oropharyngeal microbiota.

I.INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCION

Las infecciones provocadas por hongos levaduriformes han adquirido gran relevancia en las últimas décadas, constituyendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en medio hospitalario (Suleyman, G. y Alangaden, GJ., 2016). Aparecen con elevada frecuencia en pacientes inmunocomprometidos, pacientes que requieren hospitalización prolongada y aquellos a los que se les practican técnicas diagnósticas, terapéuticas o de alimentación invasivas (García-Martos, P. et al., 2001). La mayor parte de los diagnósticos de éstas infecciones se realizan en enfermos intubados o cateterizados en Unidades de Cuidados Intensivos, tratados con antibióticos de amplio espectro o en pacientes hemodializados o sometidos a nutrición parenteral (Gurguí, M. y Cuenca-Estrella, M., 2008).

Dichos hongos se encuentran de forma muy ubicua en el organismo, formando parte de la microbiota de piel, mucosas y tracto digestivo (da Silva Dantas, A. et al, 2016). Generalmente, se encuentran como comensales, compartiendo nicho con otros microorganismos; sin embargo, pueden dar lugar a sintomatología como consecuencia de un proceso de colonización por un descenso de la cantidad o el tipo de microorganismos no patógenos (que se encuentran formando parte de nuestra microbiota autóctona) o tras una infección de etiología fúngica. Se ha podido comprobar que las superficies de la mucosa oral, vaginal e intestinal sana, pueden llegar a albergar poblaciones de hongos de tamaño considerable sin que aparezca ningún síntoma de la enfermedad (Noble, SM. et al, 2017). Cuando se produce una deficiencia o descenso en los mecanismos de defensa del organismo por diversas causas como debilidad, desnutrición o ciertas patologías como la leucemia aguda o la descompensación en la cualitativa o cuantitativa de la microbiota normal, como resultado de la administración de antibióticos de amplio espectro o como consecuencia de otros procesos patológicos, estos hongos pueden causar infecciones características que pueden ser bastante graves e incluso poner en peligro la vida del paciente (Pardi, G. y Cardozo, EI., 2002).

Las infecciones por hongos constituyen uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial (Ng, KP. et al, 2015). La similitud entre los signos y síntomas que producen las infecciones fúngicas, hacen que sean difíciles de distinguir clínicamente entre ellas. De hecho, para su diagnóstico y tratamiento, se requiere

una caracterización mediante cultivos *in vitro*, en ocasiones irrealizable (Yehia, MA. et al, 2010).

Entre estos hongos levaduriformes, las especies del género *Candida* son los principales patógenos humanos, destacando *Candida albicans*. Sin embargo, desde hace unos años se han descrito otros patógenos emergentes (Leite de Andrade, MC., et al, 2017; Marcos-Zambrano, LJ. et al, 2017; Paredes K. et al, 2015; Colombo, AL. et al, 2017). *Candida albicans* es un eumiceto que pertenece al grupo de los hongos imperfectos: se encuentra prácticamente en condición de facultativamente patógeno, desde un estado de saprofitismo simple, pasando por el comensalismo hasta la situación de patógeno (Webb, BC. et al, 1998; Rindum, JL. et al, 1994). Este hongo, se encuentra libre en la naturaleza, de donde es posible aislarlo. En el ser humano podemos encontrarlo como comensal en el tracto respiratorio, intestinal, y en mucosa vaginal y oral; también en los pliegues naturales de la piel, donde se acumula mayor humedad. (da Silva Dantas, A. et al, 2016).

La infección suele originarse en superficie de piel o de mucosas. Esta infección se ve favorecida por la extensión de superficie colonizada y la densidad de población de *Candida*, la discontinuidad de la superficie de piel y mucosas, el empleo de antibióticos de amplio espectro, un elevado número de tratamientos antibióticos, duraciones de tratamiento prolongada, presencia de bacterias en sangre, nutrición parenteral y el tratamiento con corticoides u otras técnicas que disminuyan la actividad del sistema inmune. (Fernández Alonso, R. et al, 2005) (Pfaller, MA. y Diekema, DJ., 2005). La manifestación clínica de mayor relevancia que desencadena la colonización por *Candida albicans* es la infección de la mucosa de la cavidad oral. De hecho, la candidiasis orofaríngea es una patología muy extendida en todo el mundo (Pappas, PG. et al, 2009): la dificultad en el abordaje terapéutico de la misma, el desarrollo de resistencias farmacológicas por parte del agente etiológico y el hecho de que dicho patógeno se presente como oportunista constituyen importantes obstáculos a la hora de afrontar el tratamiento de los pacientes afectados por *Candida*. Además, debe añadirse la ubicuidad del hongo de forma natural en la microbiota de gran parte de la población (Rindum, JL. et al, 1994). La infección oral por *Candida* normalmente tiene carácter autolimitante, remitiendo cuando se restaura la microbiota normal, sin embargo, en ciertos grupos de población, tales como

inmunodeprimidos, trasplantados, ancianos o pacientes con tratamiento antibiótico crónico el hongo puede fortalecerse y cronificarse, complicando la patología. Otra característica que influye en la aparición de la candidiasis es la capacidad del hongo de formar biopelículas sobre diversos materiales dificultando la penetración de fármacos. Varios autores (Boucherit-Atmani, Z. et al, 2011) han relacionado la morbi-mortalidad de las infecciones por *Candida* con la capacidad para formar biopelículas. El problema añadido de estas biopelículas es, aparte del complicado abordaje intrínseco que conllevan, la dificultad que presenta, en algunos casos, la eliminación del catéter contaminado, requiriéndose condiciones moderadamente severas, como el empleo de ácido peracético (Quindós, G. et al, 1996).

Se ha evidenciado la relación entre muchas de las infecciones por *Candida* spp. y la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales, válvulas cardíacas protésicas y otros dispositivos biomédicos (Sardi, JC. et al, 2013). Las biopelículas son comunidades muy heterogéneas de microorganismos que se unen a superficies vivas o inertes, recubriéndose de una matriz extracelular de estructura polisacáridica, que forma un complejo tridimensional, con capacidad de resistencia frente a tratamientos con fármacos antimicrobianos y frente a los mecanismos de defensa del organismo hospedador. La formación de biopelículas es muy frecuente en dispositivos biomédicos que están en contacto con piel y/o mucosas (Kojic, EM. y Darouiche, RO., 2004), contaminándose dicho dispositivo como la causa principal de infecciones sistémicas. independientemente del material con que el catéter esté fabricado; si bien, ciertos materiales son más propensos a la adhesión del microorganismo (Troillet, N. et al, 1993). De hecho, el National Institutes of Health ha estimado que entre el 65% y el 80% de infecciones humanas son provocadas por biopelículas patógenas (Jamal, M. et al, 2018).

Entre las especies de *Candida*, el patógeno formador de biopelículas más prevalente es *Candida albicans*, que puede provocar infecciones tanto superficiales como sistémicas. Otros microorganismos con un papel importante como patógenos formadores de biopelículas serían *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* (Kumar, A. et al, 2017). La causa de la infección es la migración del microorganismo desde el punto de inserción del catéter en la piel

hacia la punta, lo que contribuye a la colonización intraluminal del mismo. (Ramage, G. et al, 2005; Douglas, LJ., 2003). En estados avanzados, estos microorganismos, pueden provocar una septicemia al desprenderse y pasar a sangre (Jabra-Rizk, MA. et al, 2004; Niimi, M. et al, 2010).

La colonización fúngica del catéter y la formación de la biopelícula que desemboca en micosis invasiva está considerada como un problema de salud muy grave (Enoch, DA. et al, 2017), ya que se relaciona con alta morbilidad/mortalidad, necesidad de tratamiento múltiple y mal pronóstico (Quindós, G. et al, 2009; Uppuluri, P. y Lopez-Ribot, JL., 2010; Uppuluri, P. et al, 2009). De hecho, varios estudios de cohortes (Cruciani, M. et al, 2005) demuestran la relación existente entre la morbi-mortalidad en pacientes hospitalizados por infección de *Candida* y la facilidad en la formación de biopelículas del hongo.

La retirada del dispositivo contaminado es obligatoria debido a la resistencia de las biopelículas de *Candida* al tratamiento antifúngico convencional; esta retirada conlleva implicaciones serias e incluso arriesgadas para la vida del paciente. (Valentín A. et al, 2007; Hassan, F. et al, 2009; Venkatesh, M. et al, 2009).

La incidencia de las infecciones fúngicas superficiales y mucocutáneas no es despreciable (Pemán, J. y Salavert, M., 2013), incluso cuando la mayoría de ellas quede sin diagnosticar (Ministerio de Ciencia e Innovación, 2017). Ante el aumento y la gravedad que las infecciones hospitalarias de *Candida* conllevan, se están ensayando técnicas para evitar la formación de biopelículas en catéteres, tales como la modificación de la superficie del polímero (Xu, LC. y Siedleck, CA., 2011), el uso de combinaciones de antibióticos con agentes antisépticos (Raad, I. et al, 2011) o el empleo de polianilinas funcionalizadas (Gizdavic-Nikolaidis. M. et al, 2011). Varios autores (Normand, S. et al, 2005) han señalado la posibilidad de llevar a cabo una profilaxis antibiótica con Nistatina para evitar la formación de biopelículas y reducir la peligrosidad de la infección por *Candida*. Uno de los principales inconvenientes del abordaje del tratamiento de estas infecciones es que el agente etiológico permanece inidentificado y se pauta un antifúngico de amplio espectro (Murray, P. et al, 2006). Considerando el espectro antifúngico de los principales agentes utilizados (Arendrup, MC. y Patterson, TF., 2017) el hongo ha desarrollado resistencia

frente a muchos de los tratamientos existentes, lo que resta eficacia al fármaco (Manzano, P. et al, 2008/). También debe considerarse el coste del tratamiento de las infecciones fúngicas. Según estudios farmacoeconómicos (Ou, HT. et al, 2017) el gasto farmacéutico global ocasionado es muy amplio y el consumo de fármacos antifúngicos no ha parado de crecer en el mundo durante las últimas décadas, a lo que hay que sumar el riesgo añadido de aparición de resistencias (Maestre Vera, JR. y Alou Cervera, L., 2001).

Teniendo en cuenta la realidad actual de las infecciones fúngicas, planteamos el abordaje del tratamiento de la candidiasis orofaríngea y la prevención de la formación de biopelículas sobre dispositivos biomédicos. Se han desarrollado tratamientos antifúngicos de la candidiasis orofaríngea con distintos grupos de antifúngicos, entre los que destacan azoles, polienos y equinocandinas. Algunos estudios (Tobudic, S. et al, 2010) han demostrado que la combinación profiláctica de estos grupos evitaría la aparición de la infección. Nistatina puede constituir una adecuada elección de tratamiento (Normand, S. et al, 2005). Este fármaco es un polieno muy antiguo y conocido, con demostrada eficacia anti-*Candida* y económicamente muy asequible pero cuyos inconvenientes tecnológicos (baja solubilidad acuosa) y su toxicidad por vía parenteral han impedido el desarrollo de nuevas formulaciones con recursos tecnológicos novedosos. De hecho, actualmente en el mercado sólo existe una formulación de nistatina comercializada, que se presenta como una suspensión (Mycostatin ®) (Ficha técnica Mycostatin, AEMPS)

Por otra parte, se ha demostrado que la solubilización de nistatina en agua puede mejorar mediante la incorporación de tensoactivos (Croy, S. y Kwon, G., 2004) por un mecanismo de inclusión del fármaco en el interior de micelas. El tamaño de partícula de los agregados formados con estos tensoactivos será un índice básico para valorar la mejora en la solubilidad de la nistatina. El empleo de tensoactivos favorecería la estabilidad de la suspensión prolongando su vida útil y aumentando su actividad antifúngica (Mobasheri, M. et al, 2015). Otra estrategia para mejorar la solubilidad de la nistatina y reducir el tamaño de partícula, ha sido el desarrollo de una dispersión sólida (Arch Sakeer, K. et al, 2010) con nistatina, utilizando un agente de adsorción en superficie, representado por lactosa y mezclas con goma xantán. La utilización de tensoactivos u otros agentes que mejoren su solubilidad y disminuyan su

agregación, combinados con agentes suspensores o bioadhesivos podrían tener un efecto potenciador de la actividad antifúngica de la nistatina en la prevención de la formación de biopelículas, como han descrito varios autores (Rowe, R. et al, 2009).

Así, ciertos autores (Cruciani, M. et al, 2005) han puesto de manifiesto la eficacia profiláctica de la nistatina para evitar la formación de biopelículas sobre catéteres en pacientes con ventilación asistida en Unidad de Cuidados Intensivos. En comparación con tratamientos con Amfotericina B, ante los que han aparecido resistencias (Boucherit-Atmani, Z. et al, 2011), el empleo de nistatina redujo significativamente la mortalidad por infección post-*Candida*. El estudio presentó este principio activo como un modelo de eficacia y bajo coste para el tratamiento de infecciones y biopelículas producidas por distintas especies de *Candida*.

II.OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

II. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.

2.1 Objetivos:

Los objetivos de este trabajo doctoral quedan resumidos en:

Desarrollo de una formulación de nistatina que permita el tratamiento de la candidiasis orofaríngea y la inhibición de la formación de biopelículas fúngicas sobre catéteres e instrumentos de intubación, aplicando estrategias de solubilización mediante micelas con tensoactivos o la elaboración de dispersiones sólidas.

Optimización de mejoras en la solubilidad y en la tendencia a la agregación de la nistatina, con el fin de aumentar la eficacia de la nistatina en el tratamiento de infecciones fúngicas y que pueda ser una alternativa útil como tratamiento y profilaxis de la formación de biopelículas producidas por *Candida albicans*.

2.2 Planteamiento

Para la consecución de este trabajo se siguieron las siguientes etapas:

- 1- Desarrollo galénico de formulaciones de nistatina con tensoactivos como desoxicolato de sodio, labrasol y mezclas de ambos. Caracterización fármaco técnica de estas formulaciones. Determinación de su cristalinidad y tamaño de partícula.
- 2- Estudios de las formulaciones de nistatina con desoxicolato de sodio en la actividad microbiológica y en el efecto preventivo en la formación de biopelículas sobre dispositivos de usos clínico.
- 3- Desarrollo galénico de dispersiones sólidas de nistatina con maltodextrinas. Caracterización de estas formulaciones. Determinación de su cristalinidad y tendencia a la agregación.
- 4- Evaluación de la actividad antifúngica y la acción preventiva de la formación de biopelículas sobre dispositivos de uso clínico de la dispersión sólida de nistatina con maltodextrinas.
- 5- Ensayo de cesión *in vitro* de las dispersiones solidas seleccionadas en un gel de carboximetilcelulosa al 1,5%. Determinación de las cantidades liberadas al medio o retenidas en la celda de esta formulación frente a una suspensión acuosa.
- 6- Ensayo de cesión *in vivo* en voluntarios sanos de una formulación tipo gel para enjuague oral de dispersiones sólidas de nistatina con maltodextrinas, comparada con una formulación control de nistatina en suspensión acuosa.

III.DESARROLLO TEÓRICO

III.DESARROLLO TEÓRICO

3.1 Nistatina:

3.1.1 Descripción:

La nistatina es un antibiótico muy antiguo, de eficacia antifúngica reconocida y con un perfil de seguridad adecuado para su manejo en el abordaje de candidiasis orofaríngea (Lorenzo, P. et al, 2012). Es un antifúngico del grupo de los polienos y se presenta como un polvo amarillento o débilmente parduzco, de carácter higroscópico. Este fármaco se aísla de cultivos de *Streptomyces noursei*, un actinomiceto del suelo muy ubicuo (Skerman, VBD. et al, 1980). Fue descubierta en 1948 por Rachel Brown y Elizabeth Hazen (Chemical Heritage Foundation, 2016), dos investigadoras norteamericanas que aunaron esfuerzos en el desarrollo de un nuevo fármaco fungicida. Hazen cultivaba microorganismos de muestras del suelo y comprobaba su acción in vitro contra los hongos *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (patógenos que causan enfermedades muy graves); si había actividad enviaba el cultivo a Brown quien aislaba, identificaba, caracterizaba y purificaba el compuesto activo. Así, tras el cultivo de *Streptomyces noursei*, se aisló una sustancia con gran actividad antifúngica a la que calificaron como Nistatina (nystatin) en honor a su centro de trabajo (New York State Healthcare Centre) (Hazen, EL. y Brown, R., 1951). Esta molécula fue aprobada por la FDA en 1954 y lograron la patente el 25 de junio de 1957. (National Inventors' Hall of Fame, 1994; Sedeño EP., 2012). Nistatina se presenta como un sólido pulverulento higroscópico de color oscilante entre amarillo y tostado claro, con olor que recuerda a cereales. Sensible a exposición prolongada a luz, calor o aire. A partir de los 160°C, se descompone gradualmente (Remington, JP. y Gennaro, AR., 2000). Se mide en unidades internacionales, variando según la pureza del principio activo con un rango de entre 3000 - 4400 unidades internacionales (UI) que corresponderían a 1 miligramo. (Remington, JP. y Gennaro, AR., 2000).

3.1.2 Estructura química

La nistatina es el ácido ("1S,15S,16R,17R,18S,19E,21E,25E,27E,29E,31E") -33-[("2S,3S,4S,5S,6R") -4- amino- 3,5-dihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-1,3,4,7,9,11,17,37-oictahidroxi-15,16,18-trimetil-13-oxo-14,39dioxalbiciclo[33.3.1]nonatriaconta-19,21,25,27,29,31-hexaeno-36-carboxílico (Ferner, R., 1996; National Center for Biotechnology Information, 2019).

Su fórmula química es $C_{47}H_{75}NO_{17}$ y se caracteriza por poseer una cadena macrocíclica de 46 átomos de carbono, con cuatro grupos metilo, un aminoazúcar (la micosamina, que es una hexosamina) y seis dobles enlaces. Estos dobles enlaces hacen a la molécula sensible a la luz, el oxígeno y las alteraciones del pH (Lorenzo, P. et al, 2012). Presenta un peso molecular de alrededor de 926 (Ferner, R., 1996).

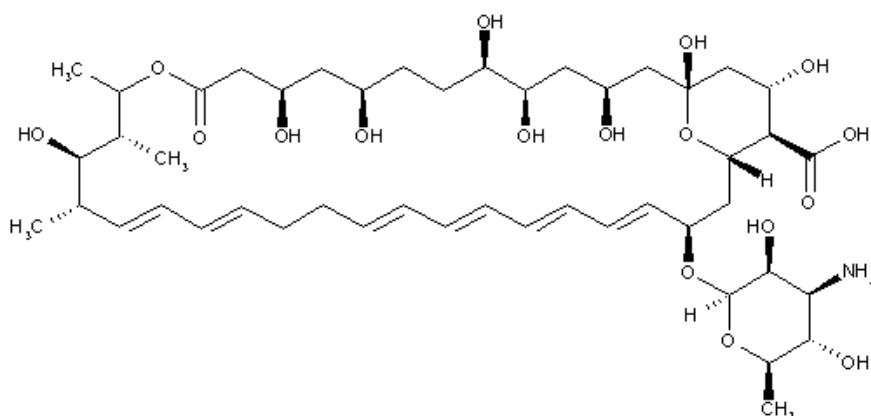


Fig. 1. Estructura de la nistatina

3.1.3 Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de la nistatina es el propio de la familia de antifúngicos polienos a la que pertenece (en la que se encuentran otros principios activos como la Anfotericina B) (Ferner, R., 1996). Nistatina se une a los esteroides de las membranas celulares, desorganizando su configuración espacial, formando canales iónicos en la membrana que modifican la permeabilidad de la membrana con pérdida de aminoácidos, purinas e iones, alterando el metabolismo celular. Su selectividad radica en que tiene mayor afinidad por el ergosterol (esterol de membrana celular de los hongos) que por el colesterol

(esterol de membranas celulares humanas) (McEvoy, GK., 2006). Sin embargo, al sí presentar capacidad de unión por colesterol, tiene una toxicidad demasiado alta para un uso sistémico (Schaffner, CP., 1984), ya que la integridad de membrana de unión de las células se deteriora, produciéndose la pérdida de potasio y otros contenidos intracelulares (Vázquez Martínez, D., 1971). Bacterias, virus y protozoos no presentan esteroides en sus membranas celulares, por lo que nistatina es ineficaz.

Presenta generalmente actividad fungistática in vivo, pero puede tener actividad fungicida a concentraciones muy elevadas o frente a organismos extremadamente susceptibles.

Durante los subcultivos repetidos a concentraciones crecientes de nistatina, *Candida albicans* no desarrolla resistencia a nistatina. Generalmente no se desarrollan resistencias a nistatina durante el tratamiento.

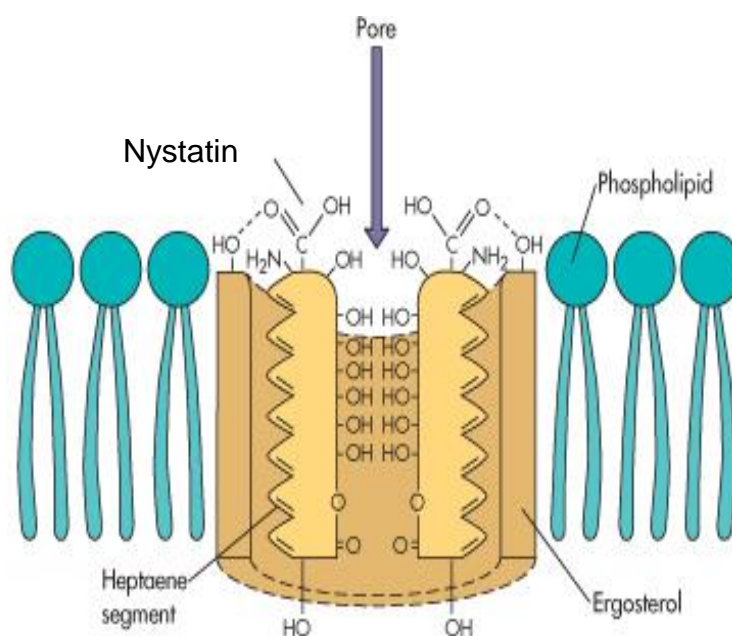


Fig 2. Mecanismo de acción de Nistatina en membrana celular de hongo

3.1.4 Farmacocinética

Prácticamente no presenta absorción por vía digestiva, salvo a dosis muy elevadas (Thomson/Micromedex., 2006). La administración tanto intramuscular como por vía intravenosa origina importantes reacciones en la zona de inyección

o efectos tóxicos, por lo que se desaconseja su uso. Tampoco se absorbe aplicada sobre piel o mucosas. La poca cantidad que pueda absorberse se desactiva en un 95% por el metabolismo, siendo su eliminación renal (Lorenzo, P. et al, 2012).

3.1.5 Solubilidad:

Nistatina es muy poco soluble en agua; prácticamente insoluble en alcohol, cloroformo, acetona y éter; ligeramente soluble en metanol y fácilmente soluble en dimetilformamida y dimetilsulfóxido. Una suspensión acuosa al 3 % presenta un pH entre 6,5 – 8,0, siendo estable cuando se calienta a 100 °C durante 10 minutos, con un pH 7 o moderadamente alcalino, pero son lábiles a pH 9 y pH 2 (Remington, JP. y Gennaro, AR., 2000).

Se han descrito los valores de solubilidad a 30°C: 4mg/ml en agua; 1,2 mg/ml en etanol; 11,2 mg/ml en metanol; 8,75 mg/ml en propilenglicol; 0,48 mg/ml en cloroformo y derivados (Remington, JP. y Gennaro, AR., 2000).

3.1.6. Espectro antimicrobiano.

El espectro de acción de nistatina es más reducido que el de otros antifúngicos de la misma familia, como la Anfotericina B; presentando actividad casi exclusivamente frente a *Candida* spp. y *Cryptococcus*. Por su mecanismo de acción, es ineficaz frente a bacterias, virus y protozoos. En la tabla 1 se recogen los rangos y medias geométricas de la concentración mínima inhibitoria frente a especies de *Candida* (Prieto Santa Anna, LM., et al, 2010).

Existen estudios *in vitro* que han demostrado su actividad frente a otras especies fúngicas como *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Lactis geotrichum*.

Tabla 1. CMI y medias geométricas de Nistatina frente a diferentes especies de *Candida*

Grupos de estudio	Especies aisladas	Nistatina (CMI)	
		Rango (µg/ml)	MG (µg/ml)
Pretratamientos	<i>C.albicans</i>	0.5-2	1,196
	<i>Candida spp.</i>	1	1
Postratamientos	<i>C.albicans</i>	0,5-2	1,389
	<i>C. farnata</i>	2	2
	<i>C. guilliermondii</i>	1	1
	<i>C. lusitane</i>	1	1
	<i>C. parapsilosis</i>	1	1

3.1.7 Indicaciones

La nistatina está indicada en infecciones cutáneas y de las mucosas originadas por la especie de hongo *Candida albicans* y las producidas por el género *Cryptococcus*.

Aunque en el laboratorio muestra efectividad sobre varios tipos de hongos que pueden afectar a la piel humana, su escasa capacidad de penetración en la piel la hacen ineficaz en la práctica diaria (Thomson/Micromedex., 2006).

También se puede usar de manera preventiva en pacientes diabéticos, inmunodeficientes, en tratamiento con corticoides y sobre todo en pacientes tratados con antibióticos que estén en riesgo de desarrollar una infección oportunista por hongos.

El uso local en piel y mucosas que presenten infección por *Candida* presenta un elevado perfil de seguridad con poca incidencia de efectos adversos y, debido a su escasa absorción digestiva, no presenta toxicidad sistémica a las dosis terapéuticas habituales.

Se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de infecciones vaginales frente a diferentes especies de *Candida*, siendo significativamente más elevada y comparada a tratamientos con fluconazol para infecciones producidas por *C. albicans* (Martins, HP., et al, 2012).

También se ha descrito la utilidad de nistatina con efecto profiláctico y preventivo de infecciones en pacientes intubados sometidos a intervención neuroquirúrgica (Ceccarelli, G. et al, 2013) y en neonatos de bajo peso con presencia de catéteres para nutrición enteral, donde demostró igual eficacia

respecto al tratamiento con fluconazol sin aparición de efectos adversos reseñables (Al-Alaiyan, S., 2012).

3.1.8 Posología:

Los datos posológicos fueron extraídos de la monografía de nistatina de la Real Farmacopea Española (AEMPS, 2015) y vienen expresados en Unidades Internacionales de nistatina. En esta monografía también se recogen datos posológicos de nistatina para el tratamiento de candidiasis intestinal, pero al no ser objeto de nuestro estudio no se reflejan aquí.

Candidiasis orofaríngea

Adultos y niños mayores de 1 año: 250.000 U.I. – 500.000 U.I. cada 6-12 horas.

Lactantes: 250.000 U.I. cada 6 horas.

Recién nacidos y lactantes con bajo peso al nacer: 100.000 U.I. cada 6 horas.

3.1.9 Especificaciones de farmacopea (RFE, AEMPS, 2015):

La Real Farmacopea Española recoge varios ensayos que este principio activo debe cumplir para que su uso sea admitido.

Ensayos recogidos en RFE:

- Absorbancia: disolver 0,10 g de la sustancia a examinar en una mezcla de 5,0 ml de ácido acético glacial R y 50 ml de metanol R y diluir hasta 100,0 ml con metanol R. Diluir 1,0 ml de esta disolución hasta 100 ml con metanol R. Medida en el máximo a 306 nm, antes de que transcurran 30 min de su preparación, la disolución debe presentar una absorbancia no menor de 0,60.
- Riqueza: utilizando Cromatografía de líquidos, el ensayo debe realizarse protegido de la luz.
- Metales pesados: como máximo 20 ppm.
- Pérdida por desecación: como máximo 5,0 %, determinado en 1000 g de la sustancia a examinar mediante desecación a 60 °C sobre pentóxido de difósforo R, a una presión no superior a 0,1 kPa durante 3h.
- Cenizas sulfúricas: como máximo 3,5 % determinadas en 1,0 g de la sustancia a examinar.

3.1.10 Formulaciones

Debido a sus propiedades farmacocinéticas y a su nula absorción sistémica, nistatina se utiliza exclusivamente en formulaciones para uso local, tanto en piel como en mucosas. Sin embargo, a pesar de ser un principio activo seguro, eficaz y económicamente muy asequible, no ha sido muy utilizado industrialmente debido a los problemas farmacotécnicos y de solubilidad que presenta.

De hecho, en la actualidad, en nuestro país existen únicamente 4 formulaciones comercializadas que contienen Nistatina como principio activo: 3 para uso tópico y sólo una para tratamiento de candidiasis oral e intestinal. El interés de este estudio se centra, en la formulación en suspensión oral, Mycostatin®, que presenta Nistatina como único principio activo y sí presenta indicaciones de uso en candidiasis orofaríngea, tanto a nivel de tratamiento como prevención de esta patología. Comercializado por Bristol-Myers Squibb, S.A, Mycostatin® se presenta en forma de suspensión oral amarillenta, opaca y homogénea, con olor a cereza y menta (Fig. 3). Cada envase contiene un frasco con 60 ml de suspensión, acompañado de una jeringa dosificadora graduada de 1 a 5 ml (para uso oral).

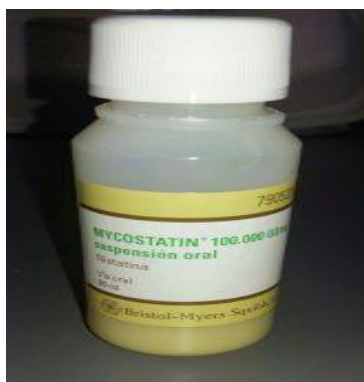


Fig. 3. Mycostatin® suspensión oral

De uso extendido con gran perfil de seguridad, ya que únicamente está contraindicado en caso de alergias a sus componentes y no siendo probable la aparición de efectos secundarios ni interacciones derivados del principio activo,

los principales inconvenientes que presenta esta preparación son su reducida estabilidad, siendo viable únicamente 7 días después de la apertura a temperatura inferior a 25°C, la necesidad de homogeneizar fuertemente (mediante agitación intensa) la suspensión antes de cada uso y la presencia de ciertos excipientes incluidos en la formulación como la sacarosa o que pueden provocar reacciones en determinados pacientes o el etanol que puede provocar dolor si la mucosa esta lesionada.

Además de las formulaciones comercializadas, se han desarrollado formulaciones magistrales de nistatina para su uso en enjuagues en tratamiento de candidiasis orofaríngea (asociado a anestésico local para tratamiento del dolor de las aftas) y existen protocolos hospitalarios establecidos para la descontaminación y prevención de formación de biopelículas en dispositivos de intubación.

En formulación magistral se ha descrito una preparación como enjuague bucal que contiene una mezcla de nistatina y lidocaína como principios activos. Esta formulación es de gran utilidad en aquellos pacientes que presentan infecciones fúngicas orofaríngeas con mucho dolor local. El inconveniente que presentan es su difícil manejo.

3.1.11 Interacciones.

La absorción sistémica de Nistatina es muy escasa y no presenta metabolismo importante a nivel hepático, con lo que no presenta interacciones importantes con fármacos ni alimentos. Debe evitar administrarse simultáneamente con otros medicamentos que formen una película sobre la mucosa intestinal o que originen un aumento en las contracciones intestinales, ya que ello implicará un menor tiempo de contacto de nistatina con la mucosa afectada y, por tanto, un menor efecto.

3.1.12 Reacciones adversas y sobredosis

Las reacciones adversas de este medicamento son leves y transitorias. Generalmente, nistatina se tolera bien a todas las edades, incluso en niños especialmente débiles y en tratamientos prolongados.

Las reacciones adversas más características son trastornos gastrointestinales como náuseas, vómitos, malestar gastrointestinal y diarrea a dosis altas.

En algunos casos, se ha comunicado la aparición de rash, incluyendo urticaria. Muy ocasionalmente, se ha manifestado el síndrome de Stevens-Johnson. También se han notificado casos de hipersensibilidad y angioedema, incluyendo edema facial.

En cuanto a la aparición de efectos tóxicos por sobredosis, la ingestión de dosis orales de nistatina superiores a 5 millones de Unidades diarias ha originado náuseas y alteraciones gastrointestinales. Dada la escasa absorción de este fármaco la posibilidad de intoxicación, incluso por ingestión accidental, es muy improbable. No obstante, en caso de producirse, interrumpir el tratamiento e instaurar la terapia adecuada de acuerdo con la sintomatología (Ferner, R., 1996).

3.2 Infecciones fúngicas:

3.2.1 Etiología

Se define infección fúngica o micosis como todo aquel proceso infeccioso cuyo agente etiológico es un hongo. Existe una amplia variedad de microorganismos dentro del reino hongos, pero son las infecciones causadas por hongos levaduriformes las que presentan una mayor importancia para el ser humano. Los microorganismos fúngicos más destacados como agentes etiológicos de estas micosis son *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Aspergillus fumigatus*. (Kim, JY., 2016). La incidencia global de estas infecciones es difícil de determinar, aunque sí se dispone de datos que indican un aumento en el número de casos en estos últimos años, debido al creciente número de pacientes inmunocomprometidos afectados por estas infecciones (Vallabhaneni, S. et al, 2016).

3.2.2 Género *Candida*

Las especies fúngicas que componen el género *Candida* conforman un grupo altamente heterogéneo de microorganismos que desarrollan un crecimiento levaduriforme. Existen más de 100 especies diferentes del género

Candida, aunque la mayoría no están implicadas en infecciones clínicas. *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa entre un 90% y un 100% de las cepas aisladas de muestras de mucosa, y entre un 50% y 70% de las cepas procedentes de pacientes con infecciones nosocomiales. Otras especies del género *Candida*, con relevancia clínica serían *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. En mucha menor proporción, se encuentran las infecciones nosocomiales causadas por otras especies diferentes como *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* y *C. rugosa* (Merseguel, KB. et al, 2015).

La mayor parte de los miembros de esta familia son capaces de desarrollar un crecimiento de tipo filamentoso (pseudohifas). Únicamente dos especies, *C. albicans* y *C. dubliniensis* son capaces de formar auténticas hifas (tubos germinales) y células de paredes gruesas (clamidosporos). Las especies de *Candida* están adquiriendo relevancia clínica, ya que se trata de uno de los principales agentes de infecciones intrahospitalarias (Pfaller, MA. y Diekema, DJ., 2007). La especie predominante como agente etiológico es *C. albicans*; sin embargo, también se han descrito infecciones causados por otras especies, de carácter oportunista, que son menos susceptibles a los antifúngicos habituales, como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis*. *C. dubliniensis* y *C. albicans* comparten varios factores de virulencia, como la formación de tubos germinales y exoenzimas, y los cambios fenotípicos. *C. dubliniensis* es capaz de desarrollar una resistencia al fluconazol de forma rápida, a diferencia de *C. albicans*, lo que sugiere la presencia de un mecanismo de resistencia inducible (Jabra-Rizk, MA. et al, 2004). Las especies que forman este género han sido descritas como el grupo más importante de hongos patógenos oportunistas y constituyen la cuarta causa más frecuente de infecciones nosocomiales septicémicas, superando a cualquier agente bacteriano Gram negativo individual. Desde la década de 1980, la frecuencia de infección nosocomial por *Candida* ha aumentado de forma constante en todos los hospitales y en cualquier grupo de edad (Murray, P. et al, 2006; Martins, N. et al, 2014; Brown, GD. et al, 2014; Marín Martínez, EM. et al, 2016).

Las especies del género presentan un desarrollo levaduriforme, con células ovaladas con un tamaño de hasta 5 μm , y que pueden formar yemas o blastoconidias. Casi todas las especies, excepto *C. glabrata*, forman también pseudohifas e hifas verdaderas, como se puede observar en la figura 4.



Fig. 4. Pseudohifas y blastoconidios de *C. albicans*

Para el cultivo en laboratorio de las especies de *Candida*, se pueden utilizar medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las primeras colonias, son de tamaño muy reducido y aparecen tras periodos de incubación de 24 a 36 horas en agar Sabouraud, pudiendo alcanzar tamaños de 2 mm tras un cultivo de 7 días. El aspecto de las colonias es bastante característico: de color blanco prácticamente por completo (como puede observarse en la figura 5), tienden a adquirir un color crema al ir envejeciendo; desprenden un típico olor fermentativo, propio de las levaduras (olor a pan). Las condiciones de crecimiento in vitro requieren aerobiosis, con pH de entre 2,5 y 7,5 y temperatura entre 20 °C y 38 °C. Entre las 48 y 72 horas después de la siembra, se detecta crecimiento, pudiéndose acelerar este crecimiento en subcultivos posteriores. La Temperatura de crecimiento presenta relevancia, ya que las levaduras presentan la capacidad específica de crecer a 37°C, lo que es importante a la hora de identificar muestras clínicas. Además, la temperatura de crecimiento óptimo sirve para diferenciar la virulencia de las cepas: las cepas más virulentas crecen rápidamente entre 25 y 37°C, mientras que las poco virulentas detienen su crecimiento a 37 °C (Pardi, G. y Cardozo, EI., 2002).



Fig. 5. Fotografía de colonias de *C.albicans* en agar Sabouraud.

3.2.2.1 *Candida albicans*

Se trata de un hongo dimórfico capaz de desarrollarse de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento: como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza. En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio. El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. En forma de levadura se comporta como saprofita, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped. Macroscópicamente, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas.

En la naturaleza, *C. albicans* puede presentarse de forma libre, adquiriendo una condición facultativamente patógena, desde un estado saprofítico simple hasta patógeno, pasando por comensalismo. Es frecuente encontrarlo en la leche bovina. En el organismo humano, se encuentra como comensal en tracto respiratorio e intestinal, mucosas de vagina y boca y sobre la piel, dónde se dispone alrededor de los pliegues naturales, ya que estas zonas conservan mejor el calor y la humedad (se puede encontrar en condición facultativamente patógena, desde un estado saprofítico simple, pasando por el comensalismo, hasta la situación de patógeno. Se encuentra libre en la naturaleza donde puede ser aislado, siendo frecuente encontrarlo en la leche bovina (Vázquez, J. y Sobel, J., 2002). En el ser humano se encuentra como comensal en el tracto respiratorio e intestinal, en la vagina y boca, sobre la piel, donde reside con mayor frecuencia entre los pliegues naturales que son sitios relativamente calientes y de mayor humedad (Pardi, G. y Cardozo, EL., 2002).

Presenta un tipo de transmisión endógena por contacto a través de la piel y las mucosas y por inoculación accidental o mordedura. (Jasso Gutiérrez, L., 2011; Servicio Riojano de Salud., 2008; INSHT, 2019).

La infección causada por *C. albicans* se conoce como candidiasis o moniliasis, y se presenta como una infección superficial que aparece principalmente en individuos con el sistema inmune comprometido, afectando a la piel (intertrigo), a las mucosas (oral, genitourinaria o digestiva) y a las uñas (paroniquia o perionixis). Los síntomas son leves como: enrojecimiento, picazón y malestar. En personas con cáncer, trasplantados o con SIDA la infección puede hacerse sistémica (candidemia), y puede llegar a ser mortal.



Fig. 6. Imágenes de paroniquia, intertrigo y candidiasis oral.

3.2.2.2 Candidiasis orofaríngea

Se refiere a la infección y sobrecrecimiento de colonias de hongos del género *Candida* sobre la mucosa oral (Melkoumov, A. et al, 2013), pudiendo extenderse al esófago causando candidiasis esofágica. (Puerto, JL. et al, 2001).

Esta infección aparece tras un compromiso del sistema inmunológico, que puede ser debido a numerosos factores (Coronado-Castellote, L. y Jimenez-Soriano, Y., 2013) como afecciones de las glándulas salivares, disrupciones de la mucosa oral, tratamientos prolongados de ciertos fármacos que afecten al sistema inmune (antibióticos de amplio espectro, corticoides, antidepresivos, antitumorales y fármacos inmunosupresores), alteraciones endocrinas (diabetes mellitus, fallo renal o hipertiroidismo), factores dietéticos como la anemia ferropénica, enfermedades oncológicas o infecciones por VIH (Rodríguez

Ortega, J. et al, 2002). Esta enfermedad se considera señal precoz de infección por VIH y avanza de forma progresiva con el curso de la enfermedad.

Los síntomas que acompañan a la infección se presentan generalmente con la aparición de una pseudomembrana, conocida como estomatitis aftosa o muguet (figura 19), que se caracteriza por manchas de color crema sobre lengua, paladar y otras zonas de la mucosa oral, pudiendo aparecer incluso en piel. Si se eliminan por raspado, producen sangrado y dolor en la superficie (Puerto, JL. et al, 2001).



Fig. 7. Muguet característico de Candidiasis orofaríngea

3.2.3 Tratamiento de infecciones fúngicas:

El tratamiento de infecciones fúngicas se realiza principalmente mediante la vía tópica (Lyu, X. et al, 2016), quedando los preparados sistémicos para el tratamiento de infecciones de mayor severidad, invasivas o cuando la respuesta al tratamiento tópico es insuficiente (Epstein, JB., 1998). Clásicamente se han dividido los compuestos antifúngicos según su tipo de acción: específica o inespecífica. En nuestro medio, los tratamientos de acción inespecífica prácticamente no se utilizan (Crespo Erchiga, V. y Delgado Florencio, V., 2005).

3.2.4 Biopelículas:

Las biopelículas son comunidades muy heterogéneas de microorganismos (pueden estar compuestas por un solo tipo de microorganismos o por múltiples especies) que se unen a superficies vivas o inertes, recubriéndose con una matriz extracelular fundamentalmente polisacáridica, altamente

hidratada, que se comunica con el exterior mediante canales de agua, y se encuentran adheridas y desarrolladas sobre superficies biológicas e inertes (Rinaudi, LV. y Gonzalez JE., 2009). Estas estructuras forman un complejo tridimensional que presenta ventajas para la comunidad de microorganismos que la conforman, ya que pueden desarrollar capacidad de resistencia a fármacos antimicrobianos y frente a los mecanismos de defensa del organismo hospedador. Cuando se observa una biopelícula con el microscopio de láser confocal, pueden observarse las distintas comunidades bacterianas organizadas en forma de seta o torre y separadas entre sí por microcanales de agua o de fluidos (Kendall, MM. y Sperandio, V., 2007). La composición de la biopelícula vendría representada por bacterias, que representan un 15-20% del volumen, una matriz o glicocálix, que representaría el 75%-80%. Esta matriz puede tener carga neutra o carga polianiónica, según el tipo de exopolisacárido, por lo que pueden interactuar con distintos antimicrobianos, de forma que estos últimos quedan atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias. Además, gracias a sus cualidades pueden "modular" la acción de distintos antimicrobianos. La pérdida o alteración de un determinado polisacárido puede alterar la biopelícula, o incluso producirse desaparición (Rasmussen, TB. y Givskov, M., 2006).

Las células de las biopelículas se diferencian de sus homólogas planctónicas (en suspensión), ya que son capaces de establecer un sistema de comunicación intercelular (*quórum sensing*) que les permite reconocer cuando se alcanza el umbral de presencia, para desarrollar nuevas funciones, especialmente aquellas relacionadas con el comportamiento social, simbiótico y de permanente reconocimiento, (Nowak, M. y Kurnatowski, P., 2009), así como el incremento de la resistencia a las defensas inmunológicas y a la acción de los antimicrobianos (Valentín, A. et al, 2007; Díaz Caballero, AJ. et al, 2011). Otras ventajas ecológicas de esta forma de asociación serían la protección ante el entorno, la disponibilidad de nutrientes, la cooperación metabólica y la adquisición de nuevas características genéticas.

Las biopelículas son muy difíciles de eliminar y son fuente de infecciones recidivantes. Las infecciones que se producen de esta forma son, por ejemplo,

las infecciones urinarias, las producidas por catéteres, las del oído medio, las placas dentales, las endocarditis, las infecciones valvulares, entre otras.

La formación de la biopelícula se desarrolla en varias fases y está influenciada por parámetros ambientales e inherentes a la fijación de la célula. Como la biopelícula se desarrolla en una interfase líquido-sólido, la velocidad de flujo juega un papel fundamental a la hora de influir en el desprendimiento físico de los microorganismos. La presencia de canales para el transporte de nutrientes y desechos permite la subsistencia tras la capa impermeable formada por el exopolímero y las colonias organizadas. Esto explica también, la aparición de resistencia frente a mecanismos de defensa del hospedador y frente a antimicrobianos, que sólo afectarían a las células de las capas más superficiales (Janakiraman, V. et al, 2009). Así, los anticuerpos, las células del sistema inmune y los antimicrobianos no tienen acceso a los microorganismos más profundos. Otra característica interesante es la capacidad de adhesión a una nueva superficie de una célula que se desprende de la biopelícula inicial, ya que mantiene las características de la biopelícula inicial.

La formación de biopelícula en la cavidad oral, las células fúngicas deben adherirse en primer lugar a la superficie de la mucosa. *C. albicans* desarrolla biopelículas en tres etapas:

1ª. Fase temprana: dura las primeras 11 horas. Durante el inicio de esta fase (de 0 a 2 h), la mayoría de las células de *C.albicans* se presentan como blastosporas (forma de levadura) adheridas sobre la superficie libre. A partir de las 3 ó 4 horas, empiezan a aparecer distintas microcolonias. A las 11 horas, las células se disponen de forma conjunta formando comunidades de apariencia densa, debido al crecimiento celular y agregación en áreas de superficie irregular.

2ª. Fase intermedia: a partir de las 12 horas. Se caracteriza por la aparición de material predominantemente no celular (matriz de polisacáridos) que aparece como una capa dispersa cubriendo las microcolonias.

3ª Fase madura: entre 38 y 72 horas postinfección, se produce un aumento en la cantidad de material extracelular, llegando a cubrir las agrupaciones de colonias de *C. albicans*. La biopelícula madura consiste en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas, con frecuencia en asociación con

bacterias (Jabra-Rizk, MA. et al, 2004). Estas agrupaciones y el material extracelular en el cual están embebidas constituyen la biopelícula (Chandra, J. et al, 2001).

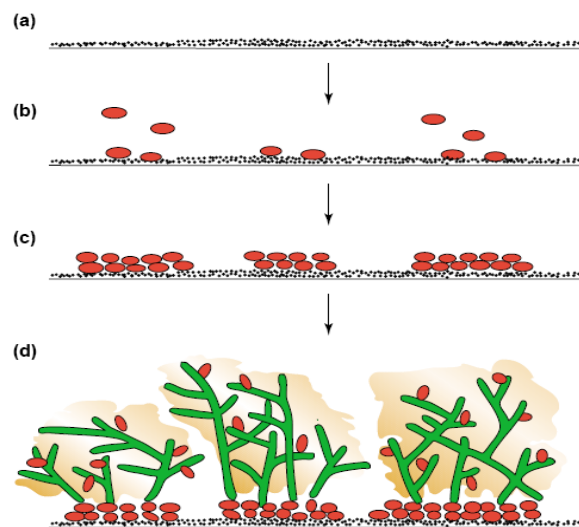


Fig. 8. Etapas en la formación de biopelículas fúngicas: (a) Superficie apta para la adherencia del microorganismo (b) Etapa temprana: adhesión del hongo sobre la superficie (c) Etapa intermedia: presencia de microcolonias (d) Etapa madura: presencia de hifas y material no celular

Las biopelículas de especies de *Candida* juegan un importante rol en medicina humana. Además, la mayoría de las manifestaciones de candidiasis, a ambos niveles mucosas y sistémico, están asociadas con la formación de biopelículas en superficies inertes o biológicas (Bachmann, SP. et al, 2002). Existen diferencias significativas entre las biopelículas de *C. albicans* y *C. glabrata* (Cataldi, V. et al, 2016). Este estudio demostró que las células de *Candida albicans* tienen mayor capacidad de formación de biopelículas que *C. glabrata*.

La formación de biopelículas fúngicas aparece con frecuencia relevante en dispositivos biomédicos que están en contacto con piel o mucosas (Kojic, EM. y

Darouiche, RO., 2004), siendo la contaminación de catéteres la principal causa de infecciones sistémicas. De hecho, el National Institutes of Health de EEUU estima que el 80% de infecciones humanas son provocadas por biopelículas patógenas (Jamal, M. et al, 2018) y se ha comprobado que más de la mitad de las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo, incluyendo candidemia, en la unidad de cuidados intensivos están relacionadas con el uso de los catéteres en los pacientes (Tumbarello, M. et al, 2007). Estos dispositivos, así como endoprótesis vasculares y otras prótesis, conectores y tubos endotraqueales, actúan como soporte físico para la colonización y formación de biopelículas por *Candida*. Tras la formación de la biopelícula, los microorganismos consiguen un efecto protector y de resistencia frente al antifúngico, lo cual trae como consecuencia importantes repercusiones clínicas. Estas infecciones, son muy difíciles de tratar y, muchas veces, requieren la extracción del dispositivo, lo que puede conllevar riesgo elevado para los pacientes.

Se han valorado varios factores que presentan relevancia en la aparición de biopelículas sobre el dispositivo:

- tipo de catéter y frecuencia de uso: dado que los catéteres venosos periféricos son los dispositivos más utilizados para conseguir acceso vascular, se producen complicaciones graves de tipo infeccioso que producen una morbilidad anual considerable por la frecuencia con la que estos catéteres se usan, a pesar de que la incidencia de infecciones en los mismos es relativamente baja.

Sin embargo, las infecciones sistémicas relacionadas con catéteres (IRC) se asocian a catéteres venosos centrales no tunelados, insertados por vía percutánea en vasos centrales, principalmente en pacientes ingresados en UCI.

- duración del tratamiento: básicamente, la mayoría de infecciones sistémicas se relacionan con tratamientos de corto plazo (< 14 días), ya que son los más utilizados. Sin embargo, catéteres para tratamientos de larga duración, cuya implantación requiere una intervención quirúrgica, presentan un riesgo mucho mayor.

- lugar de inserción: el riesgo de infección depende también del sitio de inserción del catéter: inserciones periféricas tienen mucho más riesgo que inserciones mediales.

- material del catéter: la relación entre los materiales del catéter y la capacidad *in vitro* de formación de la biopelícula se ha estudiado en varios

ensayos. Normalmente, los catéteres se fabrican con PVC, Teflon ® o poliuretano. Ciertos ensayos in vitro (Estivill, D. et al, 2011) han demostrado las diferencias y preferencias en cuanto a formación de biopelículas de las cinco especies mayoritarias de *Candida*. El principal patógeno humano, *Candida albicans* forma biopelículas más fácilmente sobre Teflon ® que sobre cualquier otro material clínico.

- otros factores: también se ha asociado riesgo de formación de biopelícula a la experiencia del personal en el proceso de inserción y el estado clínico del paciente (McGee, DC. y Gould, MK., 2003), hospitalizaciones prolongadas tras la inserción del dispositivo, y un conjunto de factores de como nutrición parenteral completa, catéteres de lumen triple, y lugares de inserción específicos (Horvath, R. y Collignon, P., 2003).

La relevancia clínica de las infecciones fúngicas se centra principalmente en las llamadas infecciones nosocomiales, aquellas que se desarrollan en un centro hospitalario. Dicha relevancia se pone de manifiesto para dar una idea de la incidencia en un estudio realizado sobre 69 millones de enfermos hospitalizados e intervenidos quirúrgicamente en EEUU entre 1998 y 2006 (Eber, MR. et al, 2010). Los resultados de este estudio indican que cerca de 48.000 personas mueren al año en EEUU por infecciones hospitalarias, generalmente neumonía y sepsis. En datos económicos, se ha estimado que los gastos de tratamientos de dichas infecciones y la prolongación de la estancia en el hospital constituyen una importante partida presupuestaria estimada en 6.000.000.000 de euros en el año 2006 (Labreche, D., 2010).

Se han desarrollado varias estrategias para intentar prevenir estas infecciones. En varios hospitales, se utilizan mezclas de antimicrobianos, principalmente en UCI, para lubricar catéteres y sondas, evitando la formación de biopelículas. Como ejemplo, en casos de nutrición enteral, se usan sondas lubricadas con suspensiones, geles y pastas de acción antimicrobiana: esta técnica se conoce como descontaminación digestiva selectiva o SDD (Selective Decontamination of the Digestive) y es utilizado con asiduidad en UCI de muchos centros hospitalarios como el hospital Virgen de la Salud de Toledo donde he realizado una estancia de investigación.

Dorocka-Bobkowska et al (Dorocka-Bobkowska, B. et al, 2003) han demostrado que tres fármacos de la familia de los polienos (anfotericina B, nistatina y natamicina), presentan la capacidad de inhibir la adhesión de distintas especies de *Candida*. La exposición a concentraciones subterapéuticas de polienos antifúngicos redujeron de forma significativa la adherencia en cepas HeLa y HSC-3 de células epiteliales al incubarse con *Candida* spp. Sin embargo, el tratamiento de las biopelículas formadas no se tradujo en eliminación significativa de la adherencia. Los datos sobre inhibición de la adhesión son concluyentes para cada uno de los 3 antifúngicos polienos. Nistatina reduce la adhesión tanto de *Candida albicans* como de *Candida glabrata*

La elección del antifúngico en estos casos debe realizarse en función de las características del mismo: seguridad y eficacia, disponibilidad y un perfil económico asequible. Las formulaciones de nistatina tópica presentan pocos efectos secundarios; eso, unido al hecho de ser más barata y fácil de conseguir que otros antifúngicos como la anfotericina B, hacen de este antifúngico la primera elección en protocolos de tratamiento. La anfotericina B, aunque fue el antifúngico que se empleó en los primeros estudios, presenta el inconveniente de su baja disponibilidad que le hace inadecuado cuando queremos realizar tratamientos en grupos elevados de pacientes. La disponibilidad de la nistatina fue el motivo fundamental para incluir este antifúngico en tratamientos de profilaxis en UCIs, con un gran número de pacientes, como la del Hospital Clínico de Madrid.

IV.SISTEMAS
MICELARES DE
NISTATINA

IV.SISTEMAS MICELARES DE NISTATINA

4.1 Introducción

Los tensoactivos o surfactantes son sustancias que modifican la tensión superficial entre un soluto y un solvente (Rosen, MJ. y Kunjappu, JT., 2012), estabilizando la presencia de un soluto de solubilidad comprometida en un solvente mediante la formación de micelas o coloides. Están formados por una cadena hidrocarbonada (lineal o aromática) que presenta un extremo hidrófilo o polar y otro no polar o hidrófobo (Figura 9). Se clasifican atendiendo a la carga magnética (Kosswig, K., 2005) que presentan en su extremo hidrófilo:

- No iónicos: no tienen carga. Entre los más utilizados se incluyen polisorbato, glicéridos polioxiacetilados, derivados de macroglicéridos y mono y di ésteres de polietilenglicol de bajo peso molecular.
- Iónicos: presentan carga en su extremo.
 - Aniónicos: la carga es negativa. Destacan estéres de sulfatos, sulfonatos y fosfatos (docusato, lauril sulfato sódico) y carboxilatos (estearato sódico).
 - Catiónicos: la carga que presentan es positiva. Se encuentran sales de amonio con carga positiva.
 - Zwitteriónicos: presentan el extremo polar con carga positiva y negativa debido a la existencia de dos grupos diferenciados. Como zwitteriones encontramos betainas y fosfolípidos.

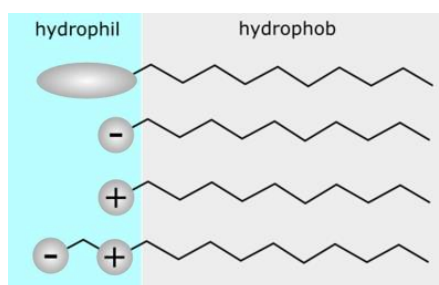


Fig. 9. Representación esquemática de un tensoactivo y sus clases.

El uso de tensoactivos reduce la tensión superficial y mejora las características de solubilidad de moléculas lipofílicas en medio acuoso. Cuando la concentración de tensoactivos supera la concentración crítica micelar (CMC), se produce la formación de micelas que engloban el fármaco en su interior. Este

fenómeno se conoce como micelización y favorece la solubilidad de sustancias poco solubles (Mu, M. et al, 2017), entre las que se encuentran varias sustancias con actividad farmacológica (Florence, AT., 1981). Además, presentan propiedades humectantes y tienen capacidad para aumentar la tasa de desintegración del sólido en partículas más finas (Edward, KH. y Li, D., 2008).

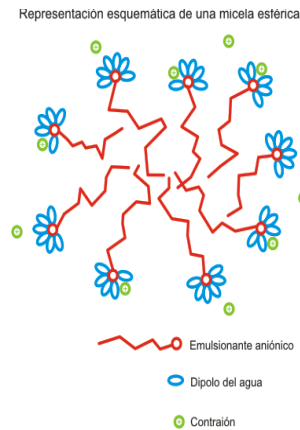


Fig 10. Representación esquemática de una micela

Se usan de forma habitual como estabilizadores de microemulsiones y suspensiones de fármacos de baja hidrosolubilidad (Martin, A., 1993; Ranguel-Yagui, CD. et al, 2005).

La nistatina es un fármaco que presenta unos valores de solubilidad acuosa en agua muy bajos (Royal Society of Chemistry, 2013). A pH fisiológico, la nistatina presenta carácter anfótero con dualidad de cargas: negativa por efecto del COOH y positiva por efecto del NH₂, como se puede ver en la figura 11. La posible inclusión del fármaco en sistemas coloidales obtenidas mediante la utilización de tensoactivos, reduciría la formación de agregados del fármaco. Además, podemos observar que una de las cadenas de la nistatina presenta un gran número de grupos OH, con lo que puede establecer puentes de hidrógeno entre sí o con las moléculas de agua. Este cambio de disposición probablemente se traduciría en una reducción del tamaño de partícula, que es un factor clave para mejorar la estabilidad acuosa y la dispersabilidad del fármaco, lo que implicaría mayor eficacia antifúngica (Edward, KH. y Li, D., 2008).

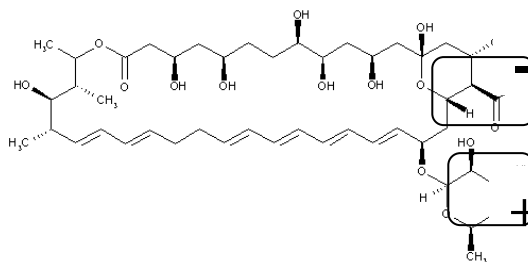


Fig. 11. Cargas relativas de la nistatina en el organismo

Varios autores (Croy, S. y Kwon, G., 2004) han demostrado que la formación de agregados de nistatina puede prevenirse por la adición de tensoactivos, como Pluronic® (tribloques de óxido de propileno y óxido de polietileno) por un mecanismo de inclusión en el interior de micelas. La eficacia se correlaciona directamente con la longitud de las cadenas hidrofóbicas, con la temperatura y con una baja CMC. Los principales factores que contribuyen a solubilizar la nistatina son el número de micelas presentes en la solución y el área accesible de la superficie del núcleo micelar. (Gangadhar KN. et al, 2014). El empleo de otros tensoactivos como el desoxicolato sódico (Thomas, DC. y Christian, SD., 1980) o macroglicéridos de caprilcaproilo (Djordjevic, L. et al, 2004) sería una buena estrategia ya que las moléculas de nistatina se ordenarían en micelas, disponiendo la parte hidrofóbica en una dirección y las cabezas cargadas en la otra. De hecho, se ha comercializado una formulación inhalatoria con Anfotericina B (antifúngico poliénico muy próximo a nistatina) en forma dimérica incluida en un sistema micelar de desoxicolato de sodio, en el que las propiedades de solubilidad y estabilidad fueron potenciadas (Gangadhar, KN. et al, 2014). Estos ensayos han servido de base para el desarrollo de nuevas formulaciones que incluyen sistemas micelares lipídicos y liposomas (López-Sánchez, A. et al, 2018).

El diseño y utilización de sistemas micelares ha demostrado su aplicación en la prevención de la formación de biopelículas: el estudio de sistemas micelares de clorhexidina ha demostrado reducir la formación de las mismas de una forma más eficaz que la suspensión simple (Tambunlertchai, S. et al, 2017); sistemas micelares combinados de imidazol resultaron en mejoría de la actividad antifúngica y de la actividad anti biopelículas (Abu Hashim, II. et al, 2015); otros sistemas micelares formados con tensoactivos con comportamiento aniónico (dodecilsulfato sódico y cremofor) han demostrado una mejora de la

adsorción en superficie y un aumento de la actividad antifúngica o antibiótica (Li, J. et al, 2010),

El uso de nistatina como principio activo ofrece ventajas como actividad de amplio espectro, accesibilidad fácil en medio hospitalario y muy baja toxicidad debido a la reducida absorción sistémica. Sin embargo, las características de hidrofobicidad de la nistatina conllevan un contacto reducido con la superficie de dispositivos clínicos. Esto, unido a su reducida estabilidad, haría muy oportuno su inclusión en complejos micelares.

4.2 Material y métodos

4.2.1 Materiales

- Agar simple DIFCO.
- Agar Sabouraud - Dextrosa DIFCO.
- Agar Mueller – Hinton PANREAC.
- Agua desionizada (Milli-Q, Millipore).
- Azul de metileno.
- *Candida albicans* CECT 1394
- Cloruro de sodio P.A. PANREAC.
- Desoxicolato de sodio PANREAC.
- Discos antibióticos Neo Sensitabs®.
- Glucosa P.A. PANREAC.
- Labrasol®, GATEFOSSE.
- Medio YNB DIFCO.
- Nistatina FRAGON.
- Sondas de silicona Mallinkroft®.

4.2.2 Aparatos y equipos

- Agitador magnético-calefactor RCT basic. Ika Labortechnik (Germany).
- Agitador vórtex.
- Analizadores de tamaño de partícula Microtrac S-3500 y Zetatrac.

- Aparato de calorimetría diferencial de barrido Mettler Toledo DSC 3, controlador TA.
- Asa de siembra.
- Autoclave HA-3D. Hirayama Manufacturing Corporation (Japan).
- Balanza Mettler AG 104. Mettler-Toledo GmbH (Schwerzenbach).
- Balanza Microanalítica Sartorius M5P Serie 30303388.
- Calibre o pie de rey.
- Difractómetro de rayos X Philips X'Pert-MPD.
- Espectrofotómetro UV-Vis Pharma Spec UV-1700.
- Estufa de incubación 30 °C - 200 °C Memmert.
- Material de vidrio.
- Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400.
- Microscopio electrónico de transmisión JEM 3000k ®.
- Purificador de agua Milli-Q Millipore.

4.2.3 Diseño de la formulación

El desarrollo de los sistemas micelares de nistatina se planteó siguiendo dos premisas:

- menor tamaño de partícula de la nistatina
- mayor actividad antifúngica de la formulación

En función de estas condiciones se elaboraron varios ensayos previos (microbiológicos y de evaluación del tamaño de partícula) para decidir qué tensoactivo es el más adecuado para formar los sistemas micelares. Se ensayaron dos clases de tensoactivos, desoxicolato de sodio como representante de la familia de tensoactivos iónicos y labrasol como no iónico.

4.2.3.1 Desoxicolato de sodio

El desoxicolato de sodio, se produce en el intestino a partir de las sales de ácido glicólico y taurocólico por la acción de enzimas bacterianas (Einarsson, K. y Hellström, K., 1974).

Algo menos de la mitad del desoxicolato de sodio producido retorna al hígado donde se produce una reacción de conjugación y se libera a la vesícula biliar (Hoffman, NE. et al, 1975). El desoxicolato sódico

industrial se obtiene a partir de la bilis bovina que es un producto secundario de la industria cárnica, obtenido mediante un proceso alcalino a elevada temperatura.

Estructura química: se trata de la sal sódica del 2-ácido (3 α ,5 β ,12 α)-3,12-Dihidroxicolan-24-oico (European Chemicals Agency). También se le conoce como desoxicolato, ácido colanoico y 3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colanato. Su fórmula es C₂₄H₃₉NaO₄ y su estructura está representada en la figura 12.

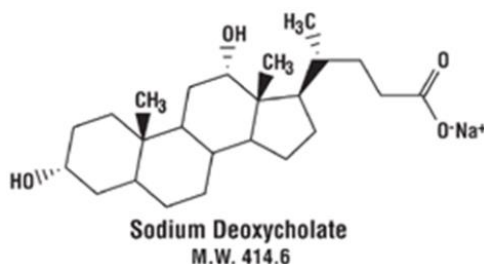


Fig. 12. Estructura del Desoxicolato de sodio

Se presenta como un polvo cristalino blanco o blanquecino muy fino, altamente irritante para la mucosa nasofaríngea. Se aconseja su manejo utilizando medidas de seguridad adecuadas.

Uso: históricamente se ha usado como intermedio para la producción de corticoesteroides con propiedades antiinflamatorias. Actualmente, se utiliza en la preparación y formulación de medios de cultivo microbiológicos y técnicas de diagnóstico (Hwang, SR. et al, 2015). En investigación, se usa como detergente biológico para lisar células y solubilizar componentes celulares y de membrana. Por sus propiedades fisicoquímicas y estructurales se trata de un tensoactivo de carácter iónico obtenido a partir de sales biliares: su carácter emulsificante le permite formar micelas de pequeño tamaño, capaces de englobar sustancia activa o componentes celulares. El tamaño y la capacidad de carga de estas micelas depende directamente de la concentración de desoxicolato (Rodríguez Cabrera, M et al, 2005).

Seguridad: el desoxicolato de sodio presenta toxicidad intrínseca debido a su naturaleza, pudiendo producir lisis celular (Latta, RK. et al, 1993).

4.2.3.2 Labrasol

Se trata de una mezcla de monoésteres, diésteres y triésteres de glicerol y monoésteres y diésteres de macrogol con una masa molecular relativa media entre 200 y 400. Se obtiene por alcoholisis parcial de triglicéridos de cadena media utilizando macrogol, por esterificación de glicerol y macrogol con ácido caprílico y ácido cáprico o por una mezcla de ésteres de glicerol y condensados de óxido de etileno con ácido caprílico y cáprico. Puede contener macrogol libre.

Se presenta como un líquido oleoso de color amarillo pálido, dispersable en agua caliente y fácilmente soluble en cloruro de metileno. Presenta un HLB de 12. (Gattefosse, 2018).

La fracción de ácidos grasos presenta cierta variabilidad, siendo la composición la que refleja la tabla 2.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de Labrasol

Nombre	Composición
Ácido Caproico	Máx. 2,0%
Ácido Caprílico	Entre 50,0% y 80,0%
Ácido Cáprico	Entre 20,0% y 50,0%
Ácido Láurico	Máx. 3,0%
Ácido Mirístico	Máx. 1,0%

Usos: la estructura química del Labrasol® (con presencia de grupos polares derivados de glicerol y macrogol; y apolares por la presencia de ácidos grasos), le confieren una gran capacidad formadora de micelas. Se trata de un tensoactivo oleoacuoso de amplio uso en la solubilización de principios activos farmacéuticos con un elevado balance hidrofilia-lipofilia (HLB) que le permite formar microemulsiones. (Djordjevic, L. et al, 2004). Varios autores (Ghosh, PK., et al, 2004) han establecido la utilidad del Labrasol® para la formación de microemulsiones estables incluso a baja concentración de surfactante. El tamaño de las partículas tras la dilución del sistema en fluido gástrico simulado también sugirió la idoneidad del sistema como medio para la administración oral de fármacos.

Seguridad: la seguridad del Labrasol® se encuentra avalada por amplias evaluaciones toxicológicas y por su utilización en productos farmacéuticos aprobados (Gattefosse, 2018).

4.2.4 Método estadístico

Las muestras se estudiaron por triplicado, expresándose los resultados en valor medio \pm desviación estándar. Las diferencias significativas se realizaron con tabla ANOVA utilizando el test de Mann-Whitney y la comparación de grupos pareados se realizó mediante el test de Tukey. Un valor de P inferior a 0,05 ha sido considerado como diferencia significativa.

4.3 Estudio de preformulación

4.3.1 Procedimiento general

El procedimiento general de preparación de las suspensiones de nistatina y tensoactivos se resume en los siguientes pasos:

- 1- En un vaso de precipitado se calienta agua destilada a 40 °C con agitación magnética suave.
- 2- Una vez se ha alcanzado dicha temperatura, se añaden cantidades suficientes de nipagin (como conservante) para obtener soluciones al 0,1 %.
- 3- Se añade la cantidad adecuada del primer tensoactivo. Se lleva al vórtex durante 2 minutos a 2000 rpm.
- 4- En caso de requerirlo, se añade el segundo tensoactivo y se lleva a vórtex durante 2 minutos a 2000 rpm.

Por último, se añade la nistatina (cantidad adecuada para concentración de 15 mg/ml) y se lleva a vórtex durante 2 minutos a 2000 rpm.

4.3.2 Proporción de tensoactivos

Las proporciones de tensoactivos ensayadas se dilucidaron tras realizar un ensayo previo de determinación del tamaño de partícula.

Proporción de desoxicolato: se ensayaron varias suspensiones con proporciones variables de nistatina con desoxicolato de sodio (1:0; 1:0,4; 1:0,8; 1:1,2) para determinar qué concentración de desoxicolato es la óptima para desarrollar una formulación con el tamaño de partícula de nistatina más pequeño. También se

evaluó el índice de polidispersabilidad (PDI) de las muestras. Los resultados obtenidos están representados en la tabla 3.

Tabla 3. Tamaño de partícula de formulaciones de Nistatina y desoxicolato de sodio.

Formulaciones	PDI	Tamaño de partícula (%)		
		> 972 nm	> 1944 nm	> 5500 nm
1:0	0,76	18,4	3,45	0,505
1:0,4	3,39	12,9	4,63	0,045
1:0,8	1	2,56	0,53	0,03
1:1,2	1,11	1,95	0,28	0,01

El estudio de las proporciones de nistatina:desoxicolato reveló que las dos formulaciones con un tamaño de partícula más reducido fueron las que contenían 1:0,8 y 1:1,2. Estas formulaciones presentan un descenso en el índice de polidispersabilidad respecto a la formulación 1:0,4. Índices de polidispersabilidad cercanos a 1 han sido considerados adecuados en trabajos previos para la determinación del tamaño de partículas (Moreno-Rodríguez, AC. et al, 2015). Además, un descenso importante en el porcentaje de partículas de 1 μm con valores de 2,56% y 1,95% para las formulaciones Nist:DC 1:0,4 y 1:0,8 respectivamente, ha sido observado en la tabla 3, presentando porcentajes menores al 1% de partículas con tamaños superiores a 2 μm . Estos resultados nos permiten seleccionar la formulación 1:0,8 para los estudios posteriores. Estudios previos mostraron una reducción similar en el tamaño de partícula de la anfotericina B cuando se incrementa la proporción de desoxicolato en el sistema micelar (Moreno-Rodríguez, AC. et al, 2015).

Proporción de labrasol[®]: la determinación de la proporción de desoxicolato (1:0,8) condicionó la cantidad de labrasol a utilizar, comparando proporciones similares de ambos tensoactivos. Así, para los ensayos posteriores se utilizaron proporciones de nistatina:labrasol de 1:0,8.

4.3.3 Determinación del tamaño de partícula

Se realizó en un aparato zetatrak que determina el tamaño de partícula de las distintas poblaciones, su tamaño medio y su índice de polidispersabilidad.

Tabla 4. Tamaño de partícula e índice de polidispersabilidad (PDI) de formulaciones de nistatina con distintas proporciones de tensoactivos.

Formulacion (Nist:Dch:Lab)	Valor medio (nm)	PDI	% part > 972 nm	% part > 1944 nm
1:0,8:0	188,6 nm (93,6%)	0,5	3,87	0,26
1:0:0,8	1198 nm (41,5%) 672 nm (58,5%)	0,94	49,58%	2,13%
1:0,4:0,4	514 nm (41,8%) 199 nm (58,2%)	1,73	4,71%	1,10%

La tabla 4 nos muestra la representación de las poblaciones de agregados de nistatina en las distintas formulaciones ensayadas. El uso de desoxicolato en la formulación (Nist:DC 1:0,8) produce una población homogénea con un tamaño medio de 188,6 nm (93,6%), mostrando una población de >972 nm (3,78%), similar a la observada en el estudio con distintas proporciones de Nist:DC. El estudio del tamaño de partícula y la influencia de la fracción de partículas de elevado tamaño sobre la estabilidad de los sistemas micelares de nistatina ha sido evaluada por otros autores (Moreno-Rodríguez, AC. et al. 2015; Gangadhar, KN. et al, 2014). Las formulaciones con labrasol presentan un perfil más heterogéneo en la que se observan dos poblaciones; una población (58,5%) de pequeño tamaño (672 nm) y una segunda población (41,5%) de elevado tamaño (1198 nm). La mezcla de ambos tensoactivos revela un descenso en el tamaño de las dos poblaciones disminuyen a valores de 199 y 514 nm, produciéndose únicamente una pequeña población (4,71%) de elevado tamaño (>972 nm). La existencia de un elevado índice de polidispersabilidad en las formulaciones de mezclas de desoxicolato de sodio y labrasol, posiblemente esté relacionado con la presencia de dos poblaciones con distinto tamaño de partícula. La presencia de estas dos poblaciones diferentes en su tamaño de partícula podría influir en la velocidad de cesión de la nistatina. En trabajos de sistemas micelares de desoxicolato con otros antifúngicos poco solubles como la anfotericina B, se observa que estos sistemas micelares de elevado tamaño de partícula presentan

una mayor toxicidad al acumularse a nivel celular o en determinados órganos como el riñón (López-Sánchez, A. et al, 2018).

4.3.4 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Mediante el TEM, se caracterizaron la morfología, el tamaño y la forma de las partículas presentes en la muestra. La preparación de las muestras se realizó por dilución de una pequeña cantidad de la muestra en acetona. A continuación, se sumerge en un baño de ultrasonidos para conseguir su máxima dispersión y se deposita una gota sobre una rejilla filmada con carbono para ser observada directamente una vez se haya secado.

Las muestras se analizaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM 3000K ® a un voltaje de aceleración de 300 kV

La figura 13 nos muestra la morfología de los cristales de nistatina en suspensión acuosa. Se observan grandes cristales de formas puntiagudas y aciculares. No hay estructuras micelares de ningún tipo

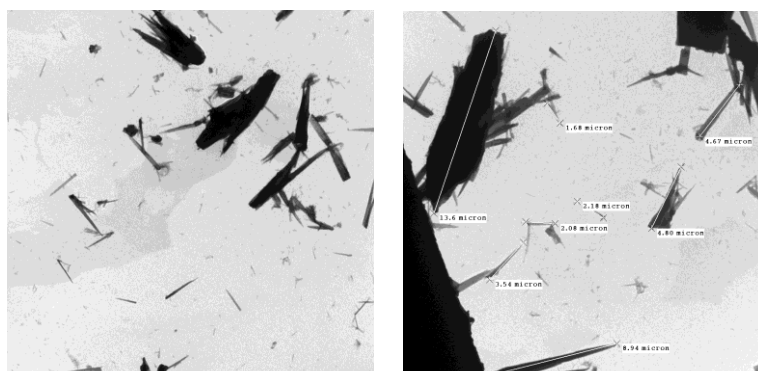


Fig. 13. Microfotografía de transmisión de una suspensión de nistatina en agua.

La imagen recogida en la figura 14 muestra la formulación Nist:DC (1:0,8), observando como el desoxicolato de sodio se dispone formando una matriz que engloba los cristales de nistatina (la presencia de algunos cristales de gran tamaño se puede atribuir a la fracción de partículas superiores a 1 mm observada en el estudio del tamaño de partícula). El desoxicolato se dispone a modo de escamas de diferente tamaño en el seno de la matriz y engloba en su interior las partículas de nistatina. Una morfología similar para la nistatina ha sido

observada en nanocompuestos de hidroxiapatita con chitosán (Hussein-Al-Ali, SH. et al, 2014).

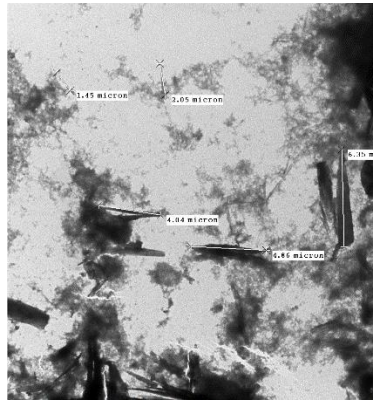


Fig. 14. Microfotografía de transmisión de una solución de desoxicolato de sodio con nistatina suspendida en proporción 1:0,8

Por último, la figura 15, nos muestra la disposición de los cristales de nistatina en una suspensión con desoxicolato de sodio y labrasol a partes iguales (1:0,4:0,4). Se aprecia una matriz más compacta en la que se aprecian los sistemas micelares de desoxicolato y algunos cristales de cristales de nistatina (alrededor de 4 μ m).

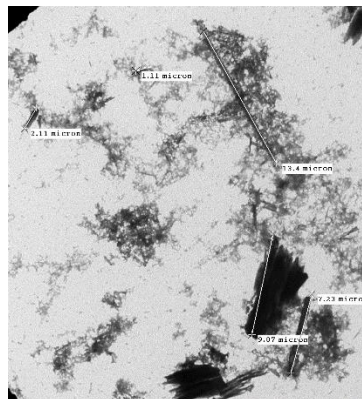


Fig. 15. Microfotografía de transmisión de una suspensión de nistatina con desoxicolato de sodio y labrasol en proporción 1:0,4:0,4

Los datos obtenidos en las microfotografías del microscopio electrónico de transmisión se correlacionan con los tamaños de partícula obtenidos en la determinación del tamaño de partícula. El mayor tamaño de partícula observado en los cristales de nistatina puede ser atribuida a una recristalización durante el proceso de secado antes de la observación por microscopia. Así, el empleo de desoxicolato de sodio únicamente, como tensoactivo, se traduce en la reducción del tamaño de los cristales de nistatina, con tamaño inferior que los que aparecen

en las imágenes obtenidas con la combinación de desoxicolato y labrasol. La población de cristales es de menor tamaño y con una distribución mucho más homogénea en las formulaciones de nistatina:desoxicolato (1:0,8). Posiblemente la existencia de una población con un tamaño de partícula más homogéneo puede ser más adecuado para obtener una rápida liberación que puede modularse mediante su incorporación en sistemas tipo gel bioadhesivo o nanocompuestos para su liberación en la cavidad bucal (Hussein-Al-Ali, SH. et al, 2014).

4.3.5 Ensayo *in vitro* de actividad antifúngica

En el estudio de la actividad antifúngica de las formulaciones es importante destacar que distintas características de la formulación, como la viscosidad y el tamaño de partícula, pueden influir en el tamaño del halo. (Jorgensen, JH. et al, 1999). El objetivo de este ensayo es demostrar la correlación entre el tamaño de partícula de la formulación y la actividad antibiótica

4.3.5.1 Procedimiento

- a) Preparación de las placas de agar Mueller Hinton suplementado con glucosa:
 - Pesada de las cantidades adecuadas de agar Mueller Hinton, glucosa y agua destilada para obtener las placas Petri necesarias
 - Disolución de los sólidos en agua desionizada. Esterilización en autoclave a 120 °C y 1 atm de presión durante 25 minutos.
 - Tras la esterilización, adición de 20 µL de solución de azul de metileno a 5 mg/ml y se dejó enfriar.
 - Antes de la solidificación total, mezcla de 3 ml de inóculo de suspensión diluida de *Candida albicans* siguiendo el patrón 0,5 de McFarland (Abs= 0,1 a λ = 600 nm).
 - Agitación suave para evitar la aparición de burbujas y extensión sobre la superficie total de la placa en zona de campana estéril.

- Solidificación y conservación en refrigeración durante 24 horas.
- b) Impregnación de los discos antibióticos: en campana estéril, se añade 20 µl volumen de cada formulación a discos antibióticos y se dejan humedecer durante 15 minutos. Las formulaciones utilizadas fueron elaboradas con las siguientes proporciones de nistatina:desoxicolato:labrasol, 1:0,8:0 (Nyst:DC:Lab [1:0,8:0]); 1:0:0,8 (Nyst:DC:Lab [1:0:0,8]) y 1:0,4:0,4 (Nyst:DC:Lab [1:0,4:0,4]). Transcurrido ese tiempo, siempre en condiciones de esterilidad, utilizando pinzas metálicas, se fijan a las placas de agar preparadas y se llevan a nevera durante 2 horas para homogeneizar el antibiótico en el disco. Tras ello, se lleva a una estufa calefactora a 37 °C durante 24 horas.
- c) Determinación de los halos de inhibición mediante un calibre. Los resultados de los halos de inhibición obtenidos se muestran en la tabla 5. El disco impregnado con blanco, no obtuvo ningún halo de inhibición. Las formulaciones activas registran en los 3 casos halos de inhibición, lo que se traduce en actividad antifúngica por parte de todas ellas. Sin embargo, la más activa de todas fue el sistema micelar con desoxicolato de sodio, obteniéndose un halo de inhibición de $21,51 \pm 0,304$ nm.

Tabla 5. Actividad antifúngica de sistemas micelares de nistatina

Muestras	Halo de inhibición a las 24 h (mm)
Blanco	0.0 ± 0.00
Nyst:DC:Lab [1:0,8:0]	$21,51 \pm 0,304$
Nyst:DC:Lab [1:0:0,8]	$16,98 \pm 1,234$
Nyst:DC:Lab [1:0,4:0,4]	$19,01 \pm 0,392$

Los datos obtenidos en el ensayo de evaluación de la actividad antifúngica se correlacionan con los datos de determinación del tamaño de partícula y con las imágenes obtenidas por TEM (figuras. 13, 14 y 15), determinando que las formulaciones de menor tamaño de partícula son las que presentan un mayor halo antifúngico. Una mejora de la actividad antifúngica de la nistatina mediante el empleo de sistemas nano y microparticulares ha sido comprobada

previamente (Hussein-Al-Ali, SH. et al, 2014). Estos resultados nos permiten seleccionar la formulación con desoxicolato en proporción 1:0,8 como sistema micelar de nistatina para estudios posteriores.

4.4 Ensayos de caracterización farmacotécnicos

Los ensayos comparativos se realizaron sobre una suspensión acuosa de nistatina, la mezcla física de principio activo y tensoactivo en proporción 1:0,8 y el sistema micelar de nistatina y desoxicolato de sodio en idéntica proporción. Se incluyó una formulación en proporción 1:0,4 para poder comprobar las variaciones obtenidas en los ensayos.

4.4.1 Aspecto

- a. Suspensión acuosa: se preparó mediante un proceso de suspensión simple de nistatina en agua a una concentración de 15mg/ml. Se obtuvo una suspensión de color amarillento. La nistatina sólida precipitó de forma rápida, acumulándose en el fondo. Sin embargo, estos precipitados de nistatina sólida pueden ser resuspendidos de forma sencilla mediante agitación manual. Se hizo recrystalizar la nistatina, evaporando el disolvente a 40°C durante 24 horas y desecando a temperatura ambiente (22-24°C) en un desecador con silica gel.
- b. Mezcla física: se realizó un proceso de mezcla manual de nistatina y desoxicolato de sodio en un mortero de cerámica con una espátula polimérica. Se prepararon formulaciones con proporciones de nistatina: desoxicolato de sodio de 1:0,4 y 1:0,8. La mezcla física de ambas sustancias originó un polvo de color amarillo tenue, que presentaba un volumen aparente mayor que el principio activo solo. Esta mezcla física es más estable que la suspensión acuosa ya que los primeros precipitados no aparecen hasta pasados 10 minutos.
- c. Sistemas micelares: varios autores han demostrado que la adición de tensoactivos puede aumentar la solubilidad acuosa de fármacos poco hidrosolubles (Rangel-Yagui, CO. et al, 2005). El tamaño de las micelas y la capacidad de carga son directamente dependientes de la concentración de desoxicolato de sodio

(Rodríguez Cabrera, M. et al, 2005). Se prepararon sistemas micelares con proporciones de Nistatina y desoxicolato de sodio en 1:0,4 v/v (SM-N:DC [1:0,4]) y 1:0,8 v/v (SM-N:DC [1:0,8]). Los sistemas micelares se formularon siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 4.3.1. La suspensión micelar formado fue desecada a una temperatura de 40°C durante un periodo de 24 horas. Tras la desecación, el sólido pulverulento fue tamizado para obtener un polvo de tamaño de partícula comprendido entre 1,2-0,1 mm, que fue conservado en viales. Los viales se sellaron y se almacenaron a temperatura ambiente (22-24°C) en un desecador con gel de silica. El polvo resultante presentaba la densidad aparente más baja, ocupando mayor volumen. La adición del polvo a una solución acuosa originó una suspensión más homogénea que permaneció estable durante más tiempo, lo que se traduce en una mayor facilidad para determinar la posología y una mejor dispersión en la cavidad oral.

4.4.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM):

El ensayo se realizó con un microscopio electrónico de barrido modelo Jeol JSM-6400 ® a un voltaje de aceleración de 20 kV. Estas imágenes se emplearán para identificar la morfología de superficie con un aumento de 3000x.

Las microfotografías se muestran en las siguientes imágenes (figuras 16-19). En ellas, podemos ver las imágenes de nistatina como materia prima, desoxicolato de sodio, la mezcla física de ambos en proporción 1:0,8 (MF-N:DC [1:0.8]) y los sistemas micelares Nistatina:desoxicolato con proporciones 1:0,4 (SM-N:DC [1:0.4]) y 1:0,8 (SM-N:DC [1:0.8]):

- la nistatina pura (figura 16) muestra unos cristales poliédricos agregados con formas afiladas y aciculares de tamaños comprendidos entre 2 y 5 µm.

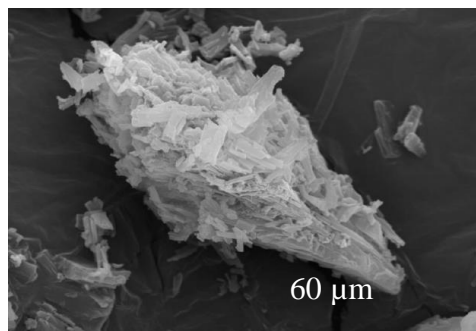


Fig 16. Microfotografía de nistatina

- los cristales de desoxicolato de sodio (Fig. 17), aparecen como escamas con tamaño oscilante entre 3 y 10 μm con una superficie plana mayor.

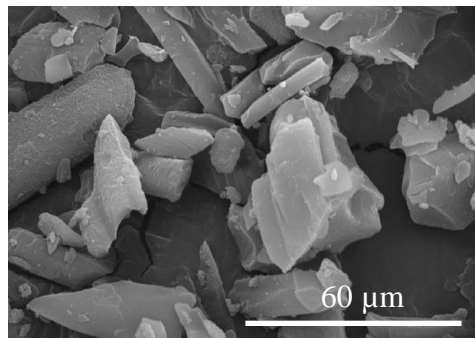


Fig. 17. Microfotografía de desoxicolato de sodio

- Ambos compuestos se diferencian en la mezcla física MF-N:DC [1:0.8] (Figura 18). En esta imagen, se aprecian cristales agregados con un tamaño mayor (10 μm) en los que los cristales de nistatina se disponen en la superficie de las escamas de desoxicolato, las cuales presentan cambios de apariencia.

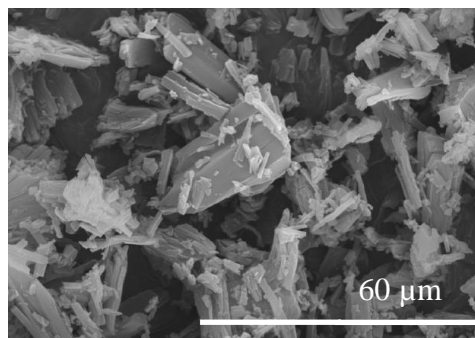


Fig. 18. Mezcla física de nistatina y desoxicolato de sodio

- En los sistemas micelares, sin embargo, no se detectaron partículas aciculares de nistatina; lo que puede explicarse por un cambio en las propiedades de hidrofilia que han hecho variar la morfología de los cristales de nistatina durante el proceso de secado. El sistema micelar con proporción 1:0,4 (SM-N:DC [1:0,4]) (Figura 19) representa la evolución

de los cristales de desoxicolato a partículas más pequeñas y regulares (1-2 μm), significativamente diferentes de las escamas primarias de gran tamaño de desoxicolato. Además, en el interior de estas partículas de desoxicolato se alojan cristales de nistatina (Palmeiro-Roldán, R. et al, 2014). Estos hechos explican la determinación de un área superficial de mayor tamaño. El aumento de la proporción del tensoactivo en el Sistema micelar 1:0,8 (SM-N:DC [1:0,8]), se tradujo en un mayor tamaño de las partículas regulares de desoxicolato (4-6 μm), lo que aumentó la superficie de disolución de nistatina (imagen no mostrada). Probablemente, el proceso de secado del desoxicolato sea el determinante de esta mejora de la solubilidad.

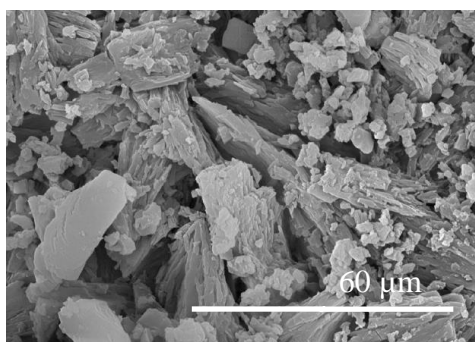


Fig. 19. Sistema micelar de nistatina con desoxicolato en proporción 1:0,4

En ninguna de las imágenes de los sistemas micelares se observaron cristales libres de nistatina, lo que indica que el principio activo se disperse de una manera homogénea en la matriz del tensoactivo. Los resultados obtenidos con la formación de sistemas micelares se correlacionan con ensayos realizados por otros autores con una técnica similar de disolución y secado (Leonardi, D. y Salomon, CJ., 2013; Fonseca-Berzal, C. et al, 2015).

4.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC):

Los termogramas de DSC se realizaron usando un aparato de calorimetría diferencial de barrido (Mettler Toledo DSC 3, controlador TA). Un estándar de calibración de Indio con un punto de transición a 156,6°C fue referencia para la obtención de la temperatura de calibrado. Las muestras, pesadas con precisión, se sellaron herméticamente en láminas de aluminio y se calentaron desde 50°C hasta 240°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min en condiciones de

purga constante de nitrógeno seco a 20 ml/min, garantizando así el aumento homogéneo de la temperatura a lo largo de todo el periodo. Se utilizó como control una lámina vacía, sellada de igual forma, validando así la realización del ensayo.

Los datos calorimétricos de nistatina pura (Nyst), desoxicolato de sodio como materia prima (DC), la mezcla física Nistatina:Desoxicolato 1:0,8 (v/v) (MF-N:DC [1:0,8]) y los sistemas micelares de nistatina y desoxicolato en proporciones 1:0,4 (v/v) (SM-N:DC [1:0,4]) y 1:0,8 (v/v) (SM-N:DC [1:0,8]) han sido representados en la figura 20.

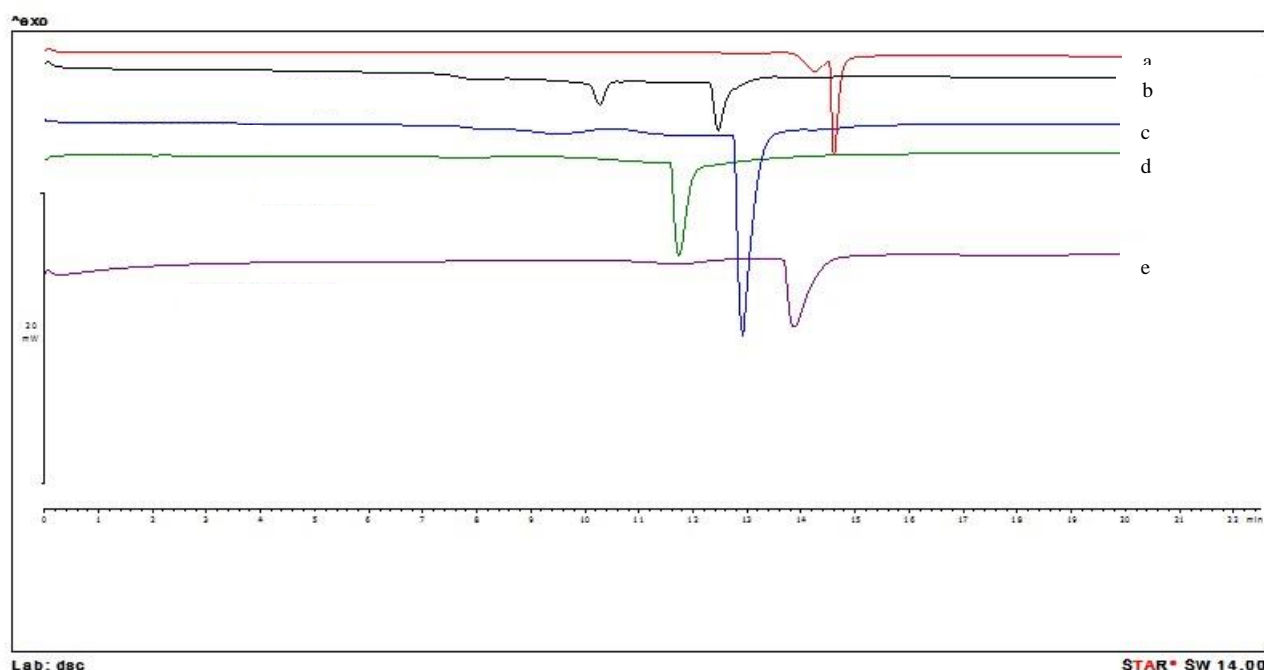


Fig. 20. Representación de los termogramas de DSC de Nyst (a), DC (b), MF-N:DC [1:0,8] (c), SM-N:DC [1:0,4] (d) y SM-N:DC [1:0,8] (e).

La curva de Nyst (Fig. 20a) muestra dos picos endotérmicos a 167,1 y 170,65 con valores de entalpía de -20,22 y -61,38 (J/g), respectivamente. Varios autores (Girotra, P. et al, 2017) han determinado que los compuestos cristalinos presentan un pico de gran tamaño a 170,65°C, que está presente en esta curva.

La cristalinidad de DC (Fig. 20b) queda patente en los dos picos endotérmicos a 127,54 y a 149, 15°C con valores de entalpía de -22,54 y -57,02 (J/g). Se ha demostrado que estos picos aparecen como consecuencia de un mayor desorden de la cristalinidad de los compuestos (Vadlapatla, R., et al, 2009; Palmeiro-Roldán, R. et al, 2014).

La mezcla física (MF-N:DC [1:0,8]) (figura 20c) presentó un pico endotérmico a 157,90°C como consecuencia de la interacción entre Nyst y DC. Así, se reduce el punto de fusión de la nistatina y se aumenta el punto de fusión del pico principal del desoxicolato. Se han descrito comportamientos similares de los puntos de fusión en mezclas de este excipiente con el antifúngico benznidazol (Palmeiro-Roldán, R. et al, 2014).

La representación de los datos calorimétricos de los sistemas micelares SM-N:DC [1:0.4] (Fig. 20d) y SM-N:DC [1:0.8] (figura 20e) muestra picos endotérmicos a 142,03°C y a 163,46°C respectivamente. La aparición de un pico endotérmico que no se presentaba antes, se pone de manifiesto en los patrones de DSC cuando se han formado sistemas micelares. Estos picos se traducen en un punto de fusión más elevado a medida que se aumenta la proporción de tensoactivo. El pico endotérmico característico de nistatina, desaparece en la gráfica de los sistemas micelares, lo que demuestra una reducción de la cristalinidad cuando se incrementa la proporción de desoxicolato. La disminución del grado de cristalinidad observada en los sistemas micelares puede explicarse por el mayor desorden que presentan las moléculas de nistatina y desoxicolato (Talukder, R. et al, 2011).

4.4.4 Difracción de rayos X (XRPD)

En nuestros ensayos, los patrones de XRPD se obtuvieron mediante un difractómetro de rayos X (Philips X'Pert-MPD, CAI Difracción Rayos X, Farmacia, UCM). Se utilizó radiación monocromática CuK ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) como fuente de irradiación de las muestras. El análisis se realizó en un intervalo entre 5 y 50° (2 θ), escaneado con un tamaño de paso de 0.04° y un periodo de 1 s por paso en todos los casos, un voltaje de 30 kV y una corriente de 30 mA.

La figura 21 contiene la distribución gráfica de los datos XRPD de Nyst pura, DC materia prima, la mezcla física de ambos en proporción 1:0,8(v/v) (MF-N:DC[1:0,8]) y los sistemas micelares de nistatina y desoxicolato en proporción 1:0,4 (v/v) (SM-N:DC [1:0.4]) y 1:0,8 (v/v) (SM-N:DC [1:0.8]).

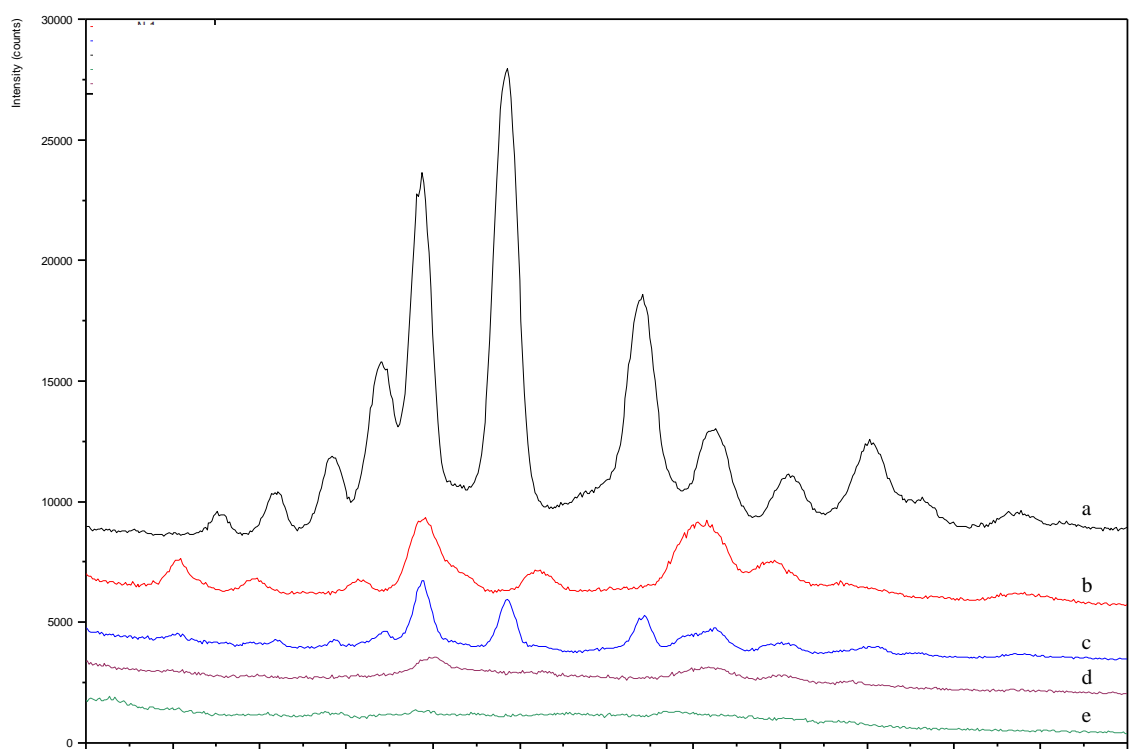


Fig. 21. Difracción de rayos X (XRPD) de DC materia prima (a), Nyst pura (b), mezcla física de ambos en proporción 1:0,8 (MF-N:DC[1:0,8]) (c) y sistemas micelares de nistatina y desoxicolato en proporciones 1:0,4 (SM-N:DC [1:0.4]) (d) y 1:0,8 (SM-N:DC [1:0.8]) (e).

Los resultados del DC (figura 21a) muestran varios picos de alta intensidad típicos de este tensoactivo de bajo peso molecular a 13,02 °, 14,14°, 15,94° y 19,26° 2θ . (Palmeiro-Roldán, R. et al, 2014).

La gráfica de nistatina como materia prima muestra una distribución propia de compuestos cristalinos (figura 21b) con picos a 8°, 14°, 16,5° y 20,5° 2θ (Park, JB. et al, 2015).

La mezcla física de principio activo y tensoactivo, MF-N:DC [1:0,8] (figura 21c), redujo la intensidad de los picos de ambos componentes, apareciendo un pico mayoritario de la nistatina a $14,14^\circ 2\theta$, $20,5^\circ 2\theta$ y un pico a $14,10^\circ 2\theta$ que puede ser atribuido a la superposición de picos de desoxicolato y nistatina. La menor intensidad de estos picos se explicaría por el efecto de dilución de la mezcla explicaría este efecto (Cerdeira, AM. et al, 2013). En el sistema micelar SM-N:DC [1:0,4] los picos de Nyst y DC prácticamente no se observan, apareciendo un ligero halo a $14,10^\circ 2\theta$ y $20,5^\circ 2\theta$ (figura 21d). Este importante descenso en la intensidad de los picos se correlaciona con los datos obtenidos en microscopía electrónica. La estructura mayoritariamente amorfa observada en este sistema micelar ha sido previamente descrita en sistemas de nifedipino (Vippagunta, SR. et al, 2002). Sin embargo, la desaparición de los picos de DC en el sistema micelar SM-N:DC [1:0,8], como consecuencia de los procesos de disolución y secado, es un dato muy relevante de dicho difractograma (figura 21e). El patrón obtenido se correlaciona con los resultados de microscopía electrónica, en cuanto a los cambios de forma y tamaño de la superficie de las partículas que corresponde al aspecto de una mezcla amorfa que incluye a la nistatina y el desoxicolato. Estos resultados están relacionados con el descenso de cristalinidad de las muestras de DC solo después de ser sometidas a este proceso, pérdidas de los picos de difracción son habituales en procesos que incluyen disolución del excipiente y el principio activo y su posterior desecación por procesos de congelación o secado (Leonardi, D. et al, 2007; García-Herrero, V. et al. 2017).

4.5 Ensayos microbiológicos:

4.5.1 Ensayo *in vitro* de actividad antifúngica:

El estudio de la actividad antifúngica se desarrolló siguiendo el procedimiento detallado en el capítulo 4.3.5.1, basado en la técnica de difusión en disco y dilución en agar (Jorgensen, JH. et al, 1999). El control negativo se llevó a cabo mediante una solución acuosa de desoxicolato de sodio. Como se ha descrito previamente, la determinación del halo de inhibición se realizó mediante un calibre de precisión. Los ensayos fueron realizados por triplicado, representándose sus valores medios y su desviación estándar. En este estudio se compararon los halos de inhibición de una solución acuosa de nistatina y del

sistema micelar SM-N:DC [1:0,8] a las 24 y a las 72 horas tras el cultivo. Los resultados de inhibición del crecimiento antifúngico están representados en la tabla 6, con unos tiempos de cultivo de 24 y 72 horas.

Tabla 6. Ensayo de difusión en disco para actividad antifúngica contra *Candida albicans* CECT 1394

Muestra	Halo de inhibición 24 h (mm)	Halo de inhibición 72 h (mm)
Blanco	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Control	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Suspensión acuosa	20,34 ± 0,42	18,64 ± 0,44
SM-N:DC [1:0,8]	22,83 ± 0,55	20,34 ± 0,82

En esta tabla se observa que las muestras control no presentaron ningún tipo de halo de inhibición de crecimiento y fueron rápidamente contaminadas. La suspensión acuosa de nistatina presentó un halo de inhibición de tamaño considerable ($20,34 \pm 0,42$ mm); sin embargo, el sistema micelar SM-N:DC (1:0,8) obtuvo tamaños de halo de inhibición mayores, lo que se explicaría por la formación de estructuras micelares que minimizan la agregación de las partículas de nistatina aumentando la humectabilidad sobre la superficie del dispositivo clínico y su difusión en el medio (Ansari, MA. et al, 2014; Jaiswal, S. et al, 2015;). Este efecto se puede explicar por la disposición de grupos hidrofílicos del tensoactivo sobre la superficie de las partículas de nistatina. De hecho, el comportamiento hidrofílico (El-Shabouri, MH., 2002) de las estructuras micelares de DC incide probablemente en el aumento de la actividad antifúngica. Este resultado confirma las observaciones de microscopía electrónica que indicaba una reducción de los agregados de nistatina en estos sistemas micelares. Por ello, los sistemas micelares SM-N:DC (1:0,8) aplicados como recubrimiento de tubos de silicona redujeron la adhesión inicial de *Candida albicans*. Los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* de las formulaciones micelares presentaron tamaños superiores incluso transcurridas 72 horas: estos resultados justificarían el uso de los sistemas micelares como recubrimiento de dispositivos clínicos en prevención a largo plazo contra la contaminación por *Candida albicans*.

La interacción entre DC y Nyst, revelada en los ensayos de caracterización de XRPD y los análisis DSC, probablemente disminuye la agregación de la nistatina y mejora su humectabilidad, características que, podrían explicar el

aumento de los halos de inhibición. De hecho, se han conseguido resultados similares con sistemas micelares de clorhexidina como recubrimiento de tubos de silicona (Tambunlertchai, S. et al, 2017).

4.5.2 Actividad preventiva de la formación de biopelículas

Se evaluó la formación de biopelículas fúngicas sobre la superficie de materiales de uso clínico utilizando una técnica derivada del método clásico de Maki (Maki, DG. et al, 1977). Esta técnica se utiliza como método de revelado de contaminación microbiana sobre dispositivos de uso clínico. Nuestro método simula la colonización y consecuente adhesión de *Candida albicans* sobre un material clínico de uso extendido.

4.5.2.1 Formación de la biopelícula

Procedimiento “*in vitro*” de infección de *Candida albicans* en sondas endotraqueales:

- se cortó 1 cm² de tubos estériles de silicona Mallinkroft en condiciones de esterilidad.
- se obtuvo un cultivo de 36 horas de *C.albicans* cultivado en agar Mueller Hinton y se preparó una suspensión fúngica en medio líquido YPD usando una torunda estéril, con un contenido de 10⁷ UFC/ml con cantidad suficiente para cubrir la parte cóncava del segmento de la sonda.
- las piezas se colocaron sobre placas Petri estériles con 12 ml de suspensión fúngica y se cultivó durante 48 horas a 31,7 ° C. Se añadió también una batería de placas de referencia.
- se realizaron lavados con NaCl 9 ‰ dejando escurrir la solución gota a gota por el segmento, para eliminar las células no adheridas. El número de lavados es importante para eliminar todas las células de *Candida albicans* que no hayan quedado adheridas. Así, se realizó el cultivo del NaCl 9 ‰, recogido del lavado para cultivo y análisis de colonias fúngicas. Se determinó en cinco el número exacto de lavados necesario para que no quedaran células libres.
- el segmento, una vez lavado, se introdujo en tubos de ensayo de 10 ml con 3 ml de NaCl 9 ‰, y se llevó a vórtex durante 1 min por dos veces.

Con esto se consiguen desprender las células adheridas que sí han formado biopelículas.

- se diluyeron 50 μL de la suspensión en $\text{NaCl } 9\text{‰}$, y se cultivó en placas de agar Sabouraud dextrosa durante 48 horas.

- tras el cultivo, se realizó el recuento de colonias formadas con las células adheridas.

- el resultado se extrapoló al volumen inicial y se obtuvo el número de UFC de *Candida albicans* que contiene 1 cm^2 .

Aplicando este procedimiento es posible comprobar el efecto preventivo o inhibitorio de la formación de biopelículas sobre dispositivos endotraqueales de las formulaciones desarrolladas.

Los resultados demostraron que la biopelícula está totalmente formada en las primeras 48 horas de cultivo, como ya había sido previamente descrito (Finkel, JS. y Mitchell, AP., 2011). Se cultivaron los lavados intermedios para evaluar el número necesario de enjuagues que aseguren la eliminación de las células planctónicas no adheridas a la superficie del material. Los datos, expresados en UFC/cm^2 , como media \pm desviación estándar, se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados microbiológicos de formación de biopelículas

Número de lavados	UFC/ cm^2 ($\bar{X} \pm \text{SD}$)
1	Incontables
2	$426,7 \pm 42,4$
3	$102,2 \pm 3,15$
4	$31,1 \pm 12,7$
5	0

El quinto lavado no mostró ningún tipo de crecimiento al cultivar el volumen utilizado en el enjuague del material. Con ello podemos concluir que no quedan células no adheridas y que los ensayos microbiológicos restantes se realizarán sobre células adheridas, que se encuentran formando la biopelícula. De hecho, tras el desprendimiento de

las biopelículas del material y su posterior cultivo, se reveló crecimiento de *C. albicans* sobre las placas de agar: se contabilizaron $135,5 \pm 8,8$ UFC demostrando así la formación de la biopelícula. Ensayos previos han revelado que la actividad preventiva de la formación de biopelículas requiere altas concentraciones de nistatina en suspensión (Dorocka-Bobkowska, B. et al, 2003).

4.5.2.2 Ensayo *in vitro* de prevención de la formación de biopelículas

Se evaluó la actividad preventiva de la formación de biopelículas mediante la aplicación de nuestro sistema micelar de nistatina y desoxicolato SM-N:DC [1:0,8] como profilaxis. El procedimiento es el mismo que el descrito previamente en el apartado 2.5.2.1, al que se le añade previamente una fase de contacto entre la formulación y dispositivos no contaminados durante un periodo de 3 minutos, simulando el enjuague de la cavidad bucal o el lavado del dispositivo clínico. Nuestra hipótesis se basa en la disminución de las UFC contabilizadas tras un contacto con nuestra formulación como profilaxis. El ensayo se realizó comparando la actividad de una suspensión acuosa de nistatina y la de nuestro sistema micelar SM-N:DC [1:0,8]: se suspendió la cantidad adecuada del polvo de cada formulación en agua para obtener una concentración de 15 mg/ml. Se dispuso, además, una batería de placas control positivo, que contenía piezas de los dispositivos clínicos sin contacto con nistatina, con el fin de asegurar la formación de la biopelícula. El control negativo (blanco) del ensayo se realizó mediante placas en blanco que contenían solventes no contaminados.

Los resultados del ensayo de prevención de formación de biopelículas se muestran en la tabla 8. Así, *C. albicans* demostró capacidad de adherencia y confirmó la formación de biopelículas en las placas control que no contenían formulaciones activas. Se contabilizaron un número medio de aproximadamente 142 UFC/cm². No se obtuvo crecimiento en las placas utilizadas como blanco.

Tabla 8. Efecto preventivo de la adhesión y la formación de biopelículas de *C.albicans* CETC 1394

	UFC/cm ² ± SD	Adhesión (%)	p-valor vs control
Control	141,10 ± 11,7	100,0	---
Suspensión acuosa	112,5 ± 10	79,7	p= 0,003
SM-N:DC (1:0.8)	82,20 ± 12	58,2	p= 0,0054

La aplicación de la suspensión acuosa de nistatina redujo la adherencia y la formación de biopelículas por *C. albicans* en alrededor de un 20%, valor que presenta diferencias estadísticamente significativas frente al control (p= 0,003). La estructura cristalina de la nistatina, revelada en los ensayos de XRPD y DSC, se relaciona con altos valores de hidrofobicidad, provocando la formación de agregados de partículas del principio activo. Este hecho, unido a la baja solubilidad acuosa, se traduce en la reducción de la actividad antifúngica preventiva de la formación de biopelículas. Sin embargo, el sistema micelar (SM-N:DC [1:0,8]) es capaz de inhibir la adherencia del hongo y la formación de la biopelícula por encima del 40%. La reducción de la formación de la biopelícula producida por el sistema micelar de nistatina y desoxicolato presenta datos estadísticamente relevantes (p= 0,0054), al ser comparadas con la suspensión acuosa de nistatina. Hemos podido comprobar, en los ensayos de rayos X y DSC, que estos sistemas micelares, con cantidades elevadas de tensoactivo, provocan una mayor interacción de las moléculas de nistatina con la estructura hidrofílica del desoxicolato. Este aumento de las propiedades hidrofílicas potencia la penetración y adsorción de nistatina en la superficie del material clínico, como se ha descrito en otros sistemas micelares con este principio activo que incorporaban Tween y Cremophor como tensoactivos (Li, J. et al, 2010). Varios autores han demostrado la inhibición de la formación de biopelículas utilizando otros principios activos antifúngicos a los que se les ha potenciado las características hidrofílicas (Jaiswal, S. et al, 2015).

4.6 Discusión parcial

El uso de tensoactivos como medio para mejorar la estabilidad y la actividad antifúngica de las suspensiones de nistatina puede ser una alternativa adecuada para el manejo de este fármaco. Aunque, a priori, podrían utilizarse tanto tensoactivos no iónicos (labrasol) como tensoactivos aniónicos (desoxicolato de sodio), las diferencias obtenidas entre ambos con respecto a la actividad antifúngica y el tamaño de partícula orientan a la utilización de desoxicolato de sodio como base del sistema micelar. De hecho, la formación de micelas con este tensoactivo posibilita la reducción de la agregación de partículas de nistatina, la transformación de estados cristalinos a estados amorfos y, en definitiva, una reducción de la cristalinidad del sistema, como hemos podido comprobar en los ensayos de microscopía electrónica, rayos X y calorimetría diferencial de barrido. Tanto la actividad antifúngica, como la actividad preventiva de la formación de biopelículas testada en ensayos *in vitro* tras su administración, aportan datos relevantes para la utilidad de la nueva formulación. Así, aunque hay que valorar diferentes parámetros presentes en situaciones clínicas, la posibilidad de utilizar nuestra formulación, tanto como tratamiento como profilaxis, ha demostrado ser una buena alternativa por: su actividad antifúngica contrastada, su baja toxicidad y su fácil manejo. Confiando a los sistemas micelares unas perspectivas de tratamiento para la candidiasis bucofaríngea en pacientes críticos, minimizando la contaminación reiterada de dispositivos biomédicos. Sin embargo, deben realizarse estudios futuros valorando la adición de transportadores hidrofílicos, que aumenten aún más la adhesión, retrasando la formación de biopelículas sobre los dispositivos.

V.DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

V. DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA.

5.1 Introducción

La solubilidad acuosa comprometida de diversos principios activos (como es el caso de nistatina) constituye uno de los problemas más importantes que dificultan el desarrollo de formulaciones activas con estas sustancias (Thayer, AM., 2010). Ya hemos demostrado que el uso de sistemas micelares puede ser una buena estrategia para conseguir una mejoría de la actividad antifúngica y preventiva de la formación de biopelículas como consecuencia de la reducción de la cristalinidad y el tamaño de las partículas de nistatina (Benavent, C. et al, 2019). Además de estos sistemas micelares, planteamos la hipótesis de realizar una formulación con nistatina utilizando una dispersión sólida, debido al gran interés que ha presentado este tipo de sistemas en el desarrollo farmacotécnico de fármacos poco solubles (Brough, C. y Williams, RO., 2013), como puede observarse en las aprobaciones de registro de nuevos medicamentos por la Federal Drug Administration (FDA) americana (Tabla 9). Se ha utilizado la tecnología de dispersiones sólidas para desarrollar formulaciones que requieren elevada carga de dosis (como Incivek, con 375 mg por unidad) o con elevada temperatura de fusión que implica tendencia a cristalizar (Kalydeco). Los polímeros más utilizados son pirrovinilpirrolidona (PVP) y derivados, y la familia de la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (Huang, Y. y Dai, WG., 2014).

Tabla 9. Medicamentos aprobados por la FDA formulados mediante dispersiones sólidas

Nombre (FDA)	Principio activo	Polímero	Dosis máx	T ^a de fusión	Método de preparación	Año de registro
Cesamet	Nabilona	PVP	1	160	—	1985
Sporanox	Itraconazol	HPMC	100	166	Evaporación	1992
Prograf	Tacrolimus	HPMC	5	128	Evaporación	1994
Kaletra	Lopinavir/Ritonavir	PVP/VA	200/50	125/122	Fusión	2005
Intelence	Etravirina	HPMC	200	265	Evaporación	2008
Zotress	Everolimus	HPMC	0,75	115	Evaporación	2010
Novir	Ritonavir	PVP/VA	100	122	Fusión	2010
Onmel	Itraconazol	HPMC	200	166	Fusión	2010
Incivek	Telaprevir	HPMCAS	375	246	Evaporación	2011
Zelboraf	Vemurafenib	HPMCAS	240	272	Co-	2011
Kalydeco	Ivacaftor	HPMCAS	150	291	Evaporación	2012

Se han definido las dispersiones solidas como aquellas dispersiones de una o varias sustancias de carácter hidrofóbico con actividad farmacológica en el seno de un transportador inerte o matriz en estado sólido y de naturaleza hidrofílica (Habib, MJ., 2000). La matriz, que puede estar constituida por un polímero o por moléculas de pequeño tamaño, puede presentarse en estado cristalino o en forma amorfa. La disposición de las moléculas de la matriz y del principio activo, origina diferentes estructuras de disposición y ordenamiento. Dichas estructuras están representadas en la figura 22, donde es posible observar las partículas cristalinas del fármaco (hexágonos rojos) y la estructura matricial del polímero (líneas azules): en función de su disposición encontramos A) la estructura ideal con el fármaco dispersado molecularmente en el seno de la matriz; B) un sistema matricial en el que ha cristalizado el principio activo fuera de la matriz y C) la matriz contiene alta carga de principio activo en estado amorfo (Huang, Y., y Dai, WG., 2014).

El desarrollo de las dispersiones sólidas comenzó en la década de 1960 por Sekiguchi y Obi (Sekiguchi, K. y Obi, N., 1961) y, desde entonces, siguen constituyendo una de las técnicas más prometedoras para el desarrollo de formulaciones con fármacos de baja solubilidad (ver tabla 9). Se han realizado dispersiones solidas con diferentes estados incluyendo mezclas eutécticas (Sekiguchi, K. y Obi, N., 1961), estados cristalinos en solución o suspensiones con transiciones cristalino/amorfo (Chiou, WL. y Riegelman, S., 1971). Los fármacos en estructura amorfa representan el estado energético más elevado alcanzable en estado sólido y presentan importantes ventajas en cuanto a su solubilidad aparente (Janssens, S. y Van den Mooter, G., 2009). En las dispersiones sólidas, el tamaño de partícula de los principios activos, puede alcanzar el tamaño molecular, favoreciendo su solubilidad acuosa (Vippagunta, SR. et al, 2007).

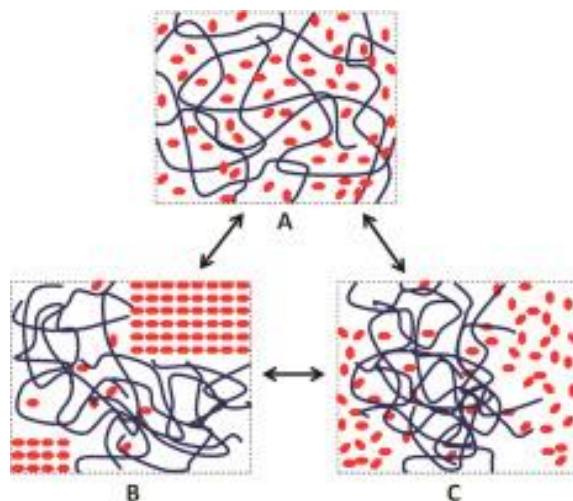


Fig. 22. Posibles estructuras en una dispersión sólida, con las moléculas del fármaco como hexágonos rojos y el polímero matriz como líneas azules: A) estructura ideal, dispersión molecular del fármaco en la matriz; B) un sistema matricial con cristalización del principio activo fuera de la matriz y C) presencia de principio activo en estado amorfo en el seno de la matriz.

Las dispersiones sólidas se han clasificado tradicionalmente en tres generaciones (Vasconcelos, T. et al, 2007), atendiendo a la naturaleza de las sustancias conformadoras de la matriz, la disposición molecular y la posible adición de tensoactivos:

- Primera generación: los transportadores hidrofílicos de primera generación eran moléculas de elevada cristalinidad como azúcares o urea. Como ejemplos, encontramos la primera dispersión sólida formulada: el sistema eutéctico diseñado por Sekiguchi y Obi (Sekiguchi, K. y Obi, N., 1961) que combinaba sulfatiazol y urea. Los ejemplos son abundantes en la bibliografía, como el sistema de ácido salicílico y urea (Collett, JH. et al, 1976) o ibuprofeno y xilitol (Greenhalgh, DJ. et al, 1999). El problema de los sistemas de primera generación es la menor velocidad de disolución de los principios activos cuando continúan en estado cristalino.
- Segunda generación: se diseñaron para solventar los problemas de la primera generación: son capaces de obtener un tamaño de partícula de la sustancia activa de rango molecular, lo que hace que se presente en estado amorfo y aumente la velocidad de disolución. Actualmente, son las que más se utilizan y dentro de este grupo encontramos transportadores hidrofílicos de naturaleza polimérica, como copovidona, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). En los medicamentos recogidos en la tabla 9, la mayoría de los transportadores son de segunda generación, debido

a su fácil manejo. Se clasifican según la disposición molecular que adoptan los transportadores y la sustancia activa: así encontramos soluciones sólidas, suspensiones sólidas o mezclas de ambos (Ouyang, D. y Smith, SC., 2015).

- Tercera generación: surgieron al dotar al transportador de propiedades autoemulgentes o de actividad en superficie. Los transportadores de estas dispersiones sólidas presentan carácter tensoactivo o están formados por mezclas de surfactantes y polímeros, como combinación de polietilenglicol y polisorbato 80 (Dannenfelser, RM. et al, 2004). Este tipo de sistemas es capaz de aumentar la estabilidad del fármaco durante un periodo más prolongado y mejoran considerablemente la biodisponibilidad de fármacos de baja solubilidad.
- Cuarta generación: de aparición más reciente, se han utilizado dispersiones sólidas asociadas a sistemas de liberación controlada para mejorar el perfil de liberación de fármacos poco solubles y con una vida media corta (Vo, CL. et al, 2013). La sustancia activa es liberada de forma prolongada, por un mecanismo de difusión y erosión, a partir de los transportadores de solubilización o de polímeros hinchable en los que previamente se ha dispersado molecularmente. Entre los polímeros más utilizados se encuentran etilcelulosa, óxido de polietileno (PEO), Eudragit, Kollidon, ...

Se han descrito 3 procedimientos de preparación de dispersiones sólidas que cuentan con aplicación en la industria farmacéutica (Brough, C. y Williams, RO., 2013; Ghule, P., 2018).

1. Método de fusión: ampliamente utilizado, este método fue la base del desarrollo de las primeras dispersiones sólidas. El procedimiento general consiste en la fusión simultánea del fármaco y el transportador, lo que permite la inclusión de cada uno de los componentes en el otro, debido al aumento de la movilidad molecular (Ouyang, D. y Smith, SC., 2015). Tras la fusión hay una fase de enfriamiento (baño de hielo, inmersión en nitrógeno líquido, extensión sobre placas inoxidable y secado en seco...). Entre los principales inconvenientes se encuentran la degradación que se produce durante el calentamiento hasta alcanzar la temperatura de fusión o la miscibilidad incompleta debido a la gran viscosidad de los transportadores en estado fundido. Para paliar dichos inconvenientes, se desarrolló el método

de extrusión de fusión caliente (Karanth, H. et al, 2006). Este método presenta mucha versatilidad en la elaboración de diferentes formas farmacéuticas, como polvos, gránulos y parches. Se ha testado como método de preparación de dispersiones sólidas de antifúngicos con solubilidad acuosa reducida (Thiry, J. et al, 2016).

2. Método de evaporación del solvente (solvent evaporation method): en este método tanto la sustancia activa como el transportador se solubilizan en un disolvente, generalmente orgánico, que es evaporado en una segunda fase (Saharan, VA. et al, 2009). Existen diferentes métodos en función de la forma de eliminación del disolvente: secado a vacío, evaporación a baja temperatura, por secado y evaporación a temperatura ambiente, uso de rotavapor, uso de nitrógeno, liofilización (Tang, X. y Pikal, MJ., 2004), secado por pulverización (spray drying) (Cal, K. y Sollohub, K., 2010) o uso de fluidos supercríticos (Thakkar, F. et al, 2009).
3. Co-precipitación: este método es útil para aquellos fármacos que presenten puntos de fusión muy elevados y sean prácticamente insolubles en los disolventes orgánicos de usos habitual (Shah, N. et al, 2013). El procedimiento general se basa en la disolución del transportador en agua y del fármaco en un disolvente orgánico. Se dispersa la solución acuosa sobre la solución orgánica, y se evaporan los disolventes por calentamiento. (Nokhodchi, A. et al, 2007).

La solubilidad acuosa de Nistatina es de 4 mg/mL a 30°C, lo que compromete seriamente el uso de un excipiente acuoso para la preparación de enjuagues o formulaciones de uso oral. Nistatina sí es soluble en disolventes orgánicos como cloroformo, dimetilsulfóxido y otros disolventes orgánicos (Remington, JP. y Gennaro, AR., 2000).

Se han ensayado dispersiones sólidas de nistatina, formuladas como comprimidos mucoadhesivos de uso oral, en las que se ha comprobado la mejora de la solubilidad de este principio activo (Arch Sakeer, K. et al, 2010). En dichos ensayos se utilizó una mezcla de nistatina y lactosa en proporción 1:3 que se mezcló con goma xantán. Los resultados demostraron una liberación del principio activo más rápida en las dispersiones sólidas que en las mezclas físicas y que en las formulaciones con tensoactivos. En la misma proporción 1:3 de principio activo y excipiente, se han ensayado dispersiones sólidas de otro fármaco antifúngico, clotrimazol, que también presenta problemas de solubilidad comprometida (Madgulkar, A. et al, 2016). El excipiente utilizado fue manitol y fue capaz de mejorar la solubilidad de clotrimazol en más del 75% con respecto a la que presenta la suspensión directa del principio activo en agua. Por ello, para tratar de mejorar la solubilidad acuosa de nistatina y con ello su actividad antifúngica y preventiva de formación de biopelículas, se planteó la posibilidad de realizar una dispersión sólida (Sekiguchi, K. y Obi, N., 1961), utilizando el método de evaporación del solvente (Tachibana, T. y Nakamura, A., 1965). Ante la necesidad de disponer de un transportador conformador de la matriz atóxico, inerte, bien tolerado y de fácil disponibilidad, se valoró la utilización de un compuesto polisacárido, Maltodextrinas (Maltrin®), excipiente de amplio uso y excelentes resultados tanto en industria farmacéutica (Durham, PG. et al, 2016) como a nivel de industria alimentaria (Lan, Y. et al, 2019).

5.2 Material y métodos:

5.2.1 Materiales:

- Agar simple DIFCO.
- Agar Sabouraud - Dextrosa DIFCO.
- Agar Mueller – Hinton PANREAC.
- Agua desionizada (Milli-Q, Millipore).
- Azul de metileno.
- *Candida albicans* CECT 1394
- Cloruro de sodio P.A. PANREAC.
- Discos antibióticos Neo Sensitabs®.
- Dimetilacetamida PANREAC.

- Glucosa P.A. PANREAC.
- Maltodextrina Maltrin ® GPC.
- Medio YNB DIFCO.
- Nistatina FRAGON
- Sondas de silicona Mallinkroft ®

5.2.2 Aparatos y equipos:

- Agitador magnético-calefactor RCT basic. Ika Labortechnik (Germany).
- Agitador vórtex.
- Aparato de calorimetría diferencial de barrido Mettler Toledo DSC 3, controlador TA.
- Aparato de disolución ERWEKA DT-80.
- Asa de siembra.
- Autoclave HA-3D. Hirayama Manufacturing Corporation (Japón).
- Balanza Mettler AG 104. Mettler-Toledo GmbH (Schwerzenbach).
- Balanza Microanalítica Sartorius M5P Serie 30303388.
- Calibrador vernier o pie de rey.
- Celdas transdérmicas P/N 65-190-047 de 0,5mm de luz demalla.
- Centrifuga Hettich D-78532, Tuttlingen, Alemania.
- Cristal violeta (violeta de genciana).
- Cubeta de cuarzo de 1cm x 1cm. Hellman. Referencia QS 1000.
- Difractómetro de rayos X Philips X'Pert-MPD.
- Envases de vidrio Tipo I.
- Espátulas de acero inoxidable.
- Espectrofotómetro UV-Vis Pharma Spec UV-1700.
- Espectrofotómetro Beckman UV-visible DU-6. Beckman Instruments, Inc. (United Kingdom).
- Espectrofotómetro IR Perkin Elmer Spectrum 100 Serie 77513.
- Estufa de incubación 30 °C - 200 °C Memmert.
- Gradillas.
- Jeringas graduadas de 5 ml.
- Matraces aforados de vidrio de 10, 25, 50 y 100 ml.

- Matracas Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml.
- Mechero Bunsen.
- Micropipetas Eppendorf Research Variables de 0,01-0,1 ml; 0,1-1 ml y de 0,5-5 ml. Eppendorf (Hamburgo, Alemania).
- Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400.
- Mortero y pistilo.
- Nevera programada a 4 °C. Corberó.
- Pipetas de vidrio graduadas.
- Pipetas Pasteur desechables de plástico de 2 ml.
- Placas Petri desechables de poliestireno de 14 mm x 90 mm.
- Puntas de plástico correspondientes a las micropipetas de 0,01-0,1 ml; 0,1-1 ml y de 0,5-5 ml Eppendorf.
- Probetas de vidrio graduadas.
- Purificador de agua Milli-Q Millipore.
- Teflones de agitación magnética.
- Tubos de ensayo de plástico y de vidrio.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Vasos de precipitados de vidrio.
- Varillas de vidrio.

5.2.3 Diseño de la formulación:

La formulación ha sido optimizada en el laboratorio siguiendo dos premisas:

- la utilización de la mínima cantidad posible de disolvente orgánico
- la capacidad de adsorción máxima del excipiente

Las dispersiones sólidas de nistatina, en las que se ha demostrado mejoría de la solubilidad del principio activo (Arch Sakeer, K. et al, 2010), se han formulado utilizando lactosa como transportador constituyente de la matriz. Así, elegimos maltodextrinas como excipiente, ya que son compuestos de uso frecuente, inocuos y de naturaleza polisacáridica.

5.2.3.1 Maltodextrina:

Se trata de una mezcla de polímeros sacarídicos de D-glucosa obtenidos por hidrólisis ácida o enzimática de almidones de uso

alimentario. Tras ello, se someten a filtrado, concentración y secado. Es un polvo o granulado inodoro, blanco o casi blanco y sin sabor dulce. Es muy fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol de 96 ° (Rowe, R. et al, 2009). Su estructura química de fórmula variable $(C_6H_{10}O_5)_n$, tiene un peso molecular que oscila entre los 900 y los 9000 Da. La estructura química puede apreciarse en la figura 23, donde pueden observarse cadenas poliméricas de glucosa de longitud variable.

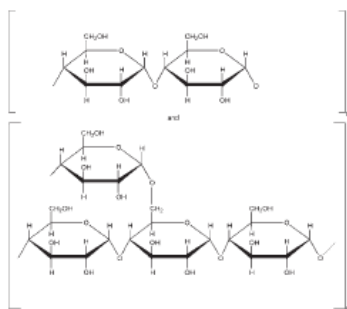


Fig. 23. Estructura química de la Maltodextrina

Usos: tiene un amplio uso en industria farmacéutica, siendo un excipiente que se utiliza como diluyente de cápsulas y comprimidos, tanto en compresión directa (Papadimitriou, E. et al, 1992) como en granulación por vía húmeda (Symecko, CW. et al, 1993), como agente de recubrimiento en solución acuosa para comprimidos, y para aumentar la viscosidad (evita cristalizaciones en preparaciones líquidas orales). Ha presentado utilidad como excipiente formador de matriz, debido a su capacidad de adsorción en superficie, en emulsiones o/w redispersables “spray-dried”, aumentando la biodisponibilidad de fármacos de solubilidad comprometida (Dollo, G. et al, 2003). Tiene aplicaciones terapéuticas directas en suplementos de nutrición oral, ya que aportan mayor densidad calórica que los azúcares simples (Rowe, R. et al, 2009). El porcentaje de uso de maltodextrinas varía según el uso al que se destine, como puede observarse en la tabla 10. Como podemos comprobar el rango de uso es amplio, llegando hasta el 99% de dosificación como diluyente, lo que demuestra la seguridad de este excipiente.

Tabla 10. Porcentaje de dosificación de maltodextrina

<i>Función</i>	<i>Porcentaje de dosificación</i>
Diluyente	10-99%
Aglutinante:	
- Vía húmeda	3-10%
- Compresión directa	2-40%
Agente de recubrimiento	2-10%
Viscosizante	5-20%
Regulador de osmolaridad	10-50%

Seguridad: se trata de hidratos de carbono fácilmente digeribles por lo que se considera seguro (GRAS) como ingrediente de consumo humano directo en las proporciones a las que se suele utilizar en las prácticas de desarrollo actuales. Como excipiente, se considera de forma general como no irritante ni tóxico. (H Grain Processing Corporation, 2008). Puede experimentar reacciones de Maillard en ciertas condiciones de pH y temperatura o ante la presencia de agentes oxidantes, produciéndose la aparición de coloración amarilla o parda, que no presenta ningún tipo de toxicidad.

5.2.3.2 Elaboración de la formulación

La técnica de obtención de la dispersión sólida fue el método de evaporación del solvente (Saharan, VA. et al, 2009).

5.2.3.2a Procedimiento general de elaboración de dispersión sólida por evaporación del disolvente

- 1- Pesada de las materias primas
- 2- Disolución del principio activo en el disolvente
- 3- Absorción de la solución sobre el excipiente
- 4- Evaporación del disolvente
- 5- Pulverización y tamización

5.2.3.2b Disolución de nistatina en NN-Dimetilacetamida:

Según los datos bibliográficos (Remington, JP. y Gennaro, AR., 2000), la nistatina es un compuesto fácilmente soluble en disolventes orgánicos como dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilformamida (DMFA). Dentro de la misma familia de disolventes orgánicos, se encuentra la dimetilacetamida (DMAc). DMAc es un disolvente frecuente en formulaciones inyectables y orales (Strickley, RG., 2008), que se considera generalmente como no tóxico cuando se usa como excipiente, aunque tiene carácter irritante para mucosas y ojos. Ha demostrado utilidad como cosolvente en la solubilización de fármacos poco solubles (Kawakami, K. et al, 2006) o en la administración parenteral de péptidos de pequeño tamaño (Larsen, SW. et al, 2004). Según ciertos estudios, este disolvente puede afectar el tamaño molecular y el grado de liberación de sustancias formuladas en nanopartículas (Jeon, HJ. et al, 2000).

DMAc se incluye como disolvente de clase 2 en la clasificación que la Agencia Europea del Medicamento (EMA) establece sobre disolvente orgánicos (European Medicine Agency, 2018). Las directrices del organismo europeo limitan el uso de este disolvente debido a la toxicidad inherente que presenta. En la tabla 11 pueden observarse las dosis diarias permitidas (PDE) (mg/día) y las concentraciones máximas (ppm). La elevada solubilidad de la DMAc y la existencia de dosis diarias permitidas mayores que para otros disolventes de su misma familia, nos hacen seleccionar este disolvente para nuestros estudios.

Tabla 11. Dosis máximas diarias y concentraciones permitidas de varios disolventes orgánicos (extraído de Table 2 Class 2 solvents in pharmaceutical products de Q3C (R7) EMA/CHMP/ICH/82260/2006)

Disolvente	PDE (mg/día)	Concentración máxima (ppm)
1,2- Dicloroetano	18,7	1870
Diclorometano	6,0	600
1,2- Dimetoxietano	1,0	11
N,N-Dimetilacetamida	10,9	1090
N,N-Dimetilformamida	8,8	800
1,4-Dioxano	3,8	380

DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

La dosis máxima diaria de DMAc de 10,90 mg/día se establece mediante el cálculo recogido en los documentos toxicológicos de la FDA (Federal Drug Administration, 1998). En este documento se ha valorado distintos tipos de toxicidad del disolvente en animales: se obtuvieron resultados negativos en genotoxicidad en varios test en ratas y hepatocitos (McGregor, DB., 1980; Zeiger, E. et al, 1988); no se observaron efectos carcinotóxicos (Malley, LA. et al, 1995); ni sobre el embarazo y la lactancia (Ferenz, RL. y Kennedy, GL., 1986).

Se realizaron varios ensayos en el laboratorio, para obtener el dato experimental de solubilidad de Nistatina en DMAc, utilizando el volumen mínimo de disolvente hasta la completa disolución de Nistatina. Los resultados pueden comprobarse en la tabla 12. Las soluciones se prepararon en un vaso de precipitados de 10 ml, en los que se añadía la cantidad de nistatina a disolver (medida en balanza de precisión) y el volumen específico de DMAc. Se llevó a agitación con agitador magnético hasta la disolución final del polvo de nistatina. Se obtiene una solución líquida de color pardo intenso, altamente viscosa y con un olor amoniacal característico, derivado del disolvente.

Tabla 12. Ensayo de disolución de Nistatina en DMAc.

Nistatina (mg)	Volumen DMAc (mL)	Disolución
300	3	SI
300	2	SI
300	1	Si
300	1,5	Si
300	0,8	SI
300	0,7	NO
300	0,5	NO

Con los resultados de disolución de nistatina en DMAc, ajustamos la solubilidad de la nistatina en dicho disolvente en 375 mg/ml. Se ajusta esta solubilidad para realizar ensayos posteriores.

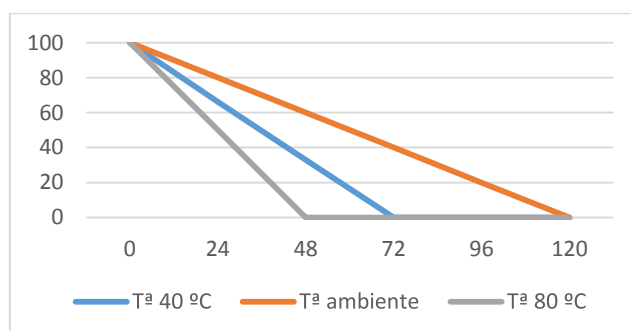
5.2.3.2c Cálculo de la proporción nistatina: maltodextrina

Como ya se ha descrito, se han ensayado previamente dispersiones sólidas de nistatina con lactosa (Arch Sakeer, K. et al,

2010). En dichos ensayos, en los que se formuló nistatina como comprimidos mucoadhesivos, la proporción de principio activo y excipiente fue de 1:3. Nuestros ensayos tomaron este dato como base para el desarrollo de la formulación de dispersiones sólidas y se realizó la evaluación experimental en un intervalo de proporciones que comprendía 1:1, 1:4, 1:6 y 1:8. Tras la desecación y la pulverización se obtuvieron diferentes fracciones pulverulentas de coloración amarillenta (más oscuro a mayor contenido de nistatina). En la formulación 1:1 se detectaron aglomerados de partículas de maltodextrinas y nistatina de elevada dureza y extremadamente difíciles de pulverizar. La homogenización mejoró a partir de la proporción 1:4, siendo máxima en la 1:6. Con la proporción 1:8, se mejoraba la pulverización, pero se presentaba una consistencia demasiado pulverulenta debido al exceso en la mezcla de maltodextrinas. Este hecho nos llevó a seleccionar proporciones entre 1:4 y 1:6 para la formulación de dispersiones sólidas y sus ensayos posteriores.

5.2.3.2d Etapa de evaporación del disolvente

La etapa de evaporación del disolvente se ensayó de varias formas, anotándose como resultado el tiempo de evaporación total. DMAc es un compuesto orgánico volátil que evapora a temperatura ambiente, concretamente a 16,5°C (Rowe, R. et al, 2009). Así, se ensayó la etapa de desecación en estufa a temperatura moderada (40°C) y a temperatura ambiente (20°C). Se ensayó también la desecación en estufa a temperatura de 80°C. Los datos de desecación pueden observarse en la figura 24.



DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

Fig. 24. Desección de las muestras de nistatina: maltodextrina 1:5 a distintas temperaturas.

Los resultados obtenidos tras el proceso de evaporación determinaron que, en todas las condiciones de temperatura ensayadas, se produce la evaporación total de la dispersión sólida. Sin embargo, el proceso varía en el tiempo según la temperatura: así, a temperatura ambiente, la evaporación total se produce a los cinco días. El proceso se acelera si utilizamos una fuente de calor, al introducirse la muestra en estufa. A una temperatura de 80°C, el proceso se completó a las 48 horas, siendo el resultado más rápido de los tres. Sin embargo, como puede apreciarse en la figura 22, en el polvo resultante aparece una coloración oscura, que probablemente sea debida a una reacción de Maillard sufrida por la maltodextrina o a un proceso de degradación de la nistatina que conlleve oscurecimiento. Esta degradación no se percibe cuando la evaporación se realiza a 40°C (figura 25), aunque el tiempo final del proceso se alargue 24 horas más. Por ello, consideramos la evaporación en estufa a 40°C como la manera óptima de eliminar el disolvente de las muestras.

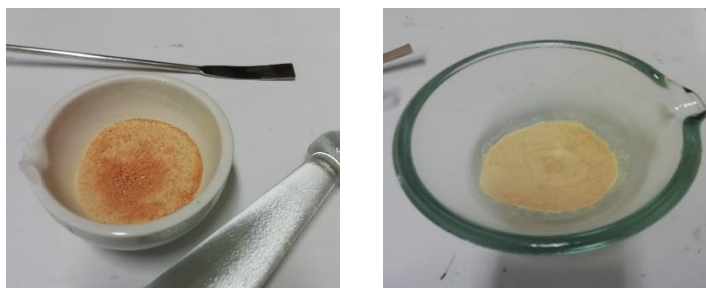


Fig. 25. Fotografía de la dispersión sólida pulverizada tras desecación a 80 °C y 40° C.

5.2.4 Procedimiento final de obtención de dispersión sólida

Los datos experimentales obtenidos en los distintos ensayos se aplicaron a la técnica general para formular la dispersión sólida

- 1- Se pesó, en balanza de precisión, la cantidad de Nistatina determinada, para obtener una concentración de 15 mg/ml.
- 2- Se disolvió en una cantidad determinada de NN-DMAc, considerando la solubilidad experimental de nistatina de 375 mg/ml. La disolución se llevó a cabo mediante agitación magnética.

- 3- Se extendió la disolución saturada de Nistatina sobre una cantidad determinada de Maltodextrina en proporción 1:6 en una placa Petri, homogeneizando hasta obtener una pasta uniforme.
- 4- Se introdujo la pasta en una estufa a 40°C durante 72 horas.
- 5- Tras la evaporación total del disolvente, se obtuvo una costra dura sobre la superficie de la placa (figura 26).



Fig. 26. Costra de dispersión sólida obtenida tras la evaporación del solvente.

- a. Se pulverizó la costra resultante en el mortero, obteniéndose un sólido pulverulento.

5.2.5 Método estadístico

Las muestras de los ensayos farmacotécnicos y microbiológicos *in vitro* se realizaron por triplicado, expresando el resultado como valor medio \pm desviación estándar. Los resultados de carga de nistatina oral han sido expresados como resultado medio de concentración en mg ó porcentaje \pm desviación estándar. Las diferencias significativas se calcularon mediante tabla ANOVA utilizando el test de Mann-Whitney y se compararon grupos pareados con el test de Tukey. Valores de P inferiores a 0,05 se consideran diferencia significativa.

5.3 Ensayos de caracterización farmacotécnicos

De la misma forma que en el estudio del sistema micelar de nistatina y desoxicolato 1:0,8 (SM-N:DC [1:0,8]) (ver capítulo 4.4) se aplicaron técnicas de microscopía electrónica (SEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis por difracción de rayos X en polvo (XRPD), la caracterización fármacotécnica de la dispersión sólida de nistatina y maltodextrina 1:6 (DS-N:MD [1:6]) se realizó siguiendo idénticos procedimientos. Mediante las técnicas citadas se realizó el estudio comparativo de la dispersión sólida (DS-

N:MD [1:6]), la mezcla física de nistatina y maltodextrina en la misma proporción (MF-N:MD [1:6]) y una suspensión acuosa de nistatina. Tanto de la mezcla física como de la dispersión sólida se ensayaron, además, proporciones de nistatina: maltodextrina de 1:3, 1:4, 1:6 y 1:8.

5.3.1 Aspecto

- a) Suspensión acuosa: los resultados obtenidos fueron idénticos a los obtenidos en los ensayos de los sistemas micelares (cap. 5.4.1.a): mediante un proceso de suspensión simple de nistatina en agua (15mg/ml), se consigue una suspensión de color amarillento. Los precipitados de nistatina sólida aparecen rápidamente y se acumulan en el fondo, aunque pueden resuspenderse fácilmente tras agitación manual. La nistatina se recrystalizó por evaporación del disolvente a 40°C durante 24 horas. El polvo obtenido se coloca en viales sellados en un desecador con sílica gel a temperatura ambiente.
- b) Mezcla física: se mezcló manualmente nistatina y maltodextrina en un mortero de cerámica con una espátula polimérica. La mezcla física 1:5 de ambas sustancias originó un polvo de color amarillento muy pálido. En las mezclas física 1:3 y 1:4 la coloración es más intensa y oscura debido a la mayor proporción del principio activo. La mezcla física 1:6 originó la coloración más débil de todas. En todos los casos, la reconstitución en solución acuosa originó una suspensión mucho más estable que la suspensión acuosa de nistatina. Los primeros precipitados aparecen a partir de los 60 minutos y pueden redispersarse rápidamente.
- c) Dispersión sólida: se prepararon las dispersiones sólidas en proporción 1:1, 1:4, 1:6 y 1:8, siguiendo el procedimiento de elaboración descrito en el capítulo 5.2.4. Tras la obtención del polvo, la fracción fue tamizada por una luz de malla entre 1,2 y 0,1 mm y fue conservado en viales sellados en un desecador con gel de sílice para eliminar el resto de humedad. La reconstitución de las dispersiones sólidas originó suspensiones de color amarillento homogéneas y realmente estables (los precipitados no aparecen hasta pasadas 48 horas) (figura 27). Este

hecho facilita la dosificación de la dispersión sólida y su efecto en la mucosa de la cavidad oral, ya que, al mejorar la estabilidad, probablemente mejore su actividad.



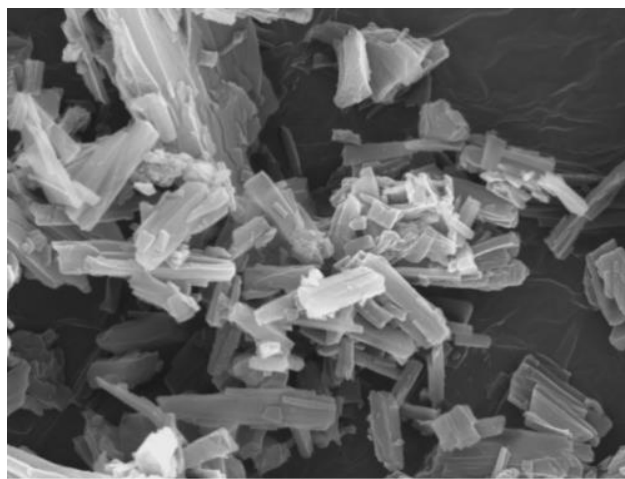
Fig. 27. Dispersión sólida suspendida en agua bidestilada

5.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El ensayo se realizó con el mismo aparato, técnica y medios que se describen en el capítulo 4.4.2. Las imágenes mostradas fueron aumentadas en toma secundaria para identificar la morfología de superficie.

Las microfotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido se recogen en las siguientes imágenes (figuras 28-41). En ellas, se recogen imágenes de nistatina como materia prima, maltodextrinas como excipiente puro, la mezcla física de ambos en proporción 1:1 (MF-N:MD [1:1]) y 1:6 (MF-N:MD [1:6]) y las dispersiones sólidas de Nistatina:maltodextrina con proporciones 1:1 (DS-N:MD [1:1]), 1:4 (DS-N:MD [1:4]), 1:6 (DS-N:MD [1:6]) y 1:8 (DS-N:MD [1:8]):

- la nistatina pura se muestra en la figura 28 con un aumento de 6000x, en la que se observan pequeños cristales ortorrómbicos de principio activo de unos 3-6 μm . Estos cristales tienden a unirse formando agregados de gran tamaño, como puede comprobarse en la figura 29, que dificultan la velocidad de cesión y la suspensión en el medio de las preparaciones extemporáneas.



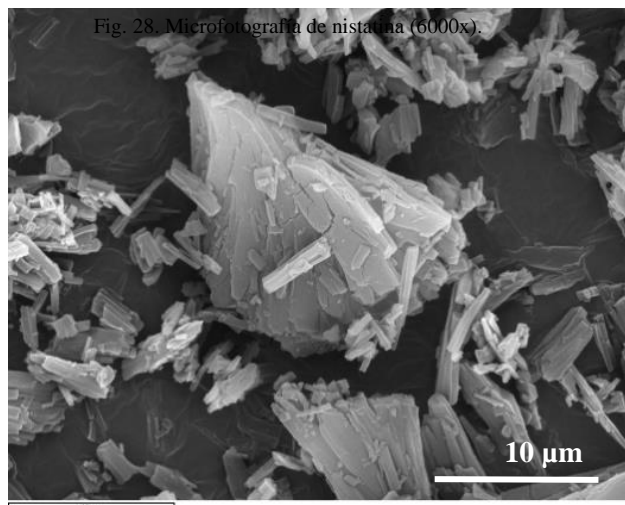


Fig. 28. Microfotografía de nistatina (6000x).

- la figura 30 recoge la morfología de las maltodextrinas con un aumento de 1000x, donde se percibe la presencia de dos poblaciones de partículas, mostrando una mayoría de partículas esféricas de pequeño tamaño (3-6 μm) y la presencia de partículas aisladas de mayor tamaño (20-50 μm). La morfología esférica se observa claramente en la figura 31, que se muestra con un aumento de 3000x.

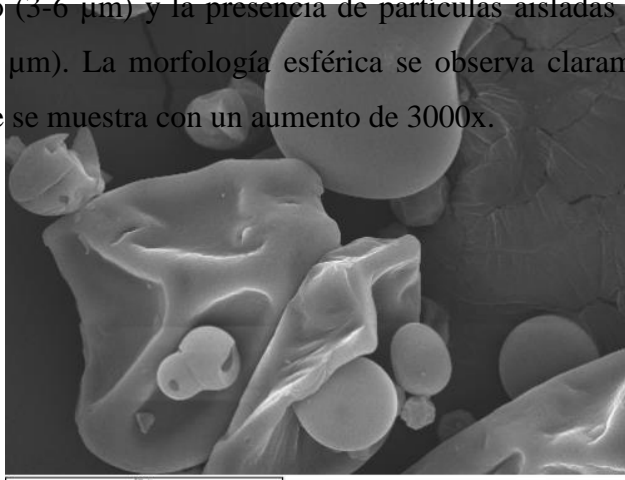


Fig. 30. Microfotografía de maltodextrina (1000x)

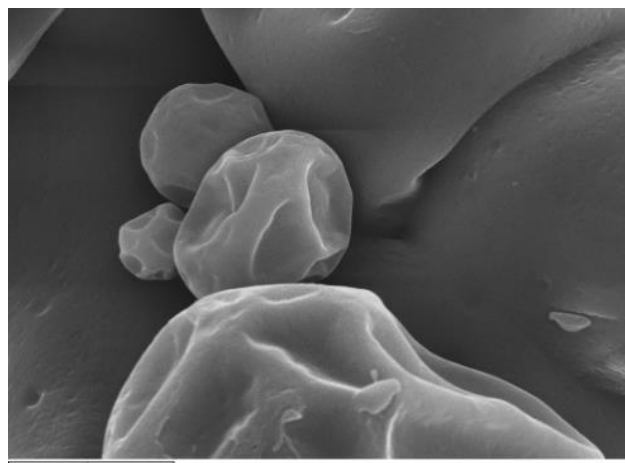


Fig. 31. Microfotografía de maltodextrina (3000x).

- la mezcla física de nistatina y maltodextrinas en proporción 1:1 se recoge en la figura 32, observándose la presencia de grandes partículas esféricas de excipiente (de entre 20- 50 μm), entre los agregados de los cristales de nistatina.

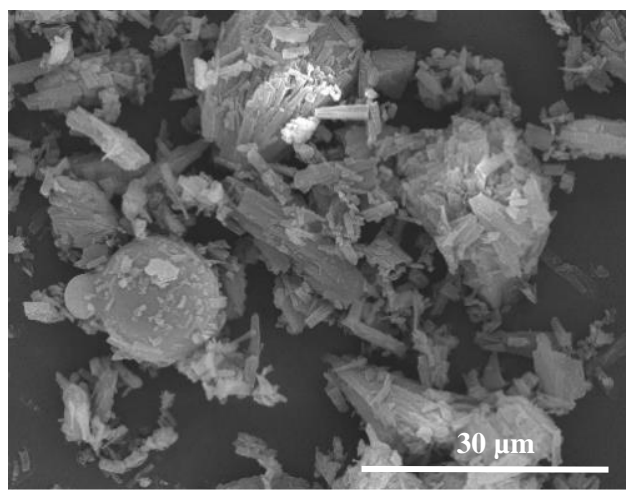
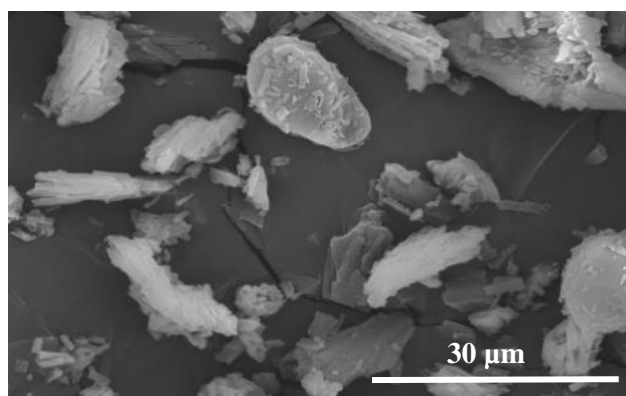


Fig. 32. Microfotografía de mezcla física de nistatina y maltodextrina en proporción 1:1 (1500x).

Cuando se incrementa la proporción de maltodextrina en la mezcla física hasta proporciones de 1:6, se pone de manifiesto una proporción mayor de partículas de maltodextrinas en el campo de observación, como puede comprobarse en la figura 33 con aumento de 1500x, haciendo que los cristales de nistatina tiendan a agregarse a la maltodextrina. Al incrementar los aumentos del microscopio hasta 3000x (figuras 34 y 35), se observa en detalle cómo se adsorben los pequeños cristales de nistatina sobre la superficie de la maltodextrina.



DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

Fig. 33. Microfotografía de mezcla física de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 (1500x).

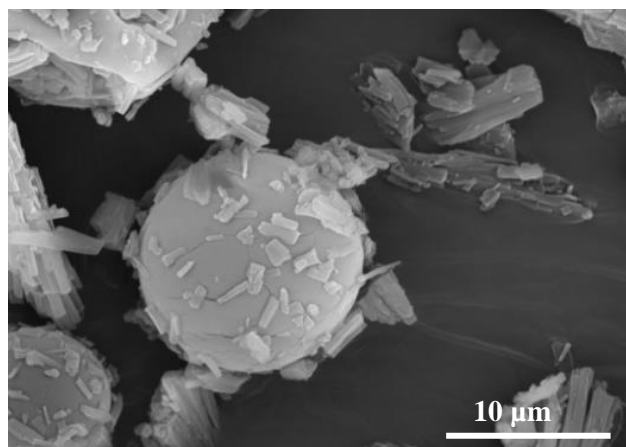


Fig. 34. Microfotografía de mezcla física de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 (3000x).

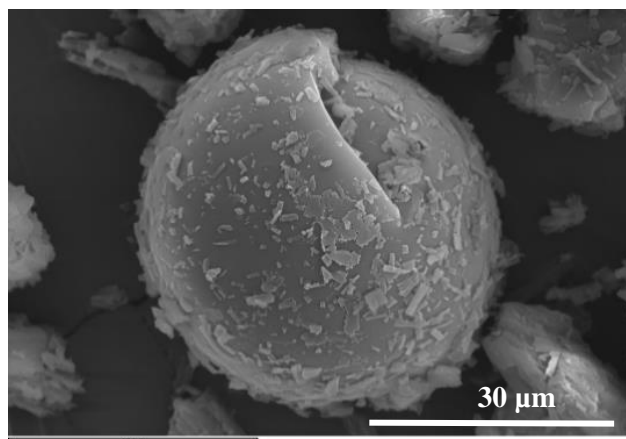


Fig. 35. Microfotografía de mezcla física de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 (3000x).

- la dispersión sólida en proporción 1:1, se recoge en la figura 36, dónde es posible observar la presencia de pequeños cristales de nistatina (2-5 µm) y agregados de cristales de nistatina de elevado tamaño (10-20 µm), destacando la presencia de pequeñas partículas de maltodextrina (2-5 µm) lisa sobre la superficie de estos agregados.

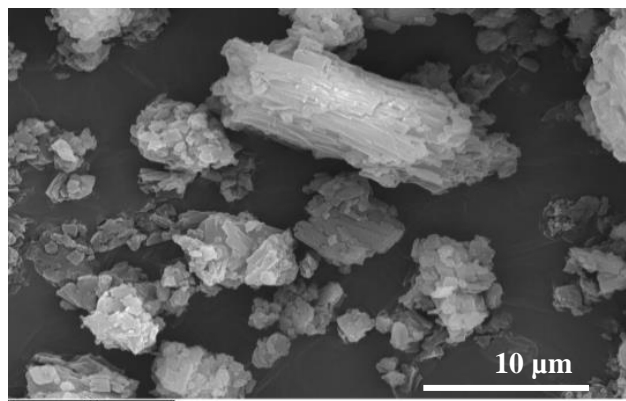


Fig. 36. Microfotografía de dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:1 (3000x).

La figura 37 muestra la morfología de la dispersión sólida de nistatina con maltodextrina en proporción 1:4. Al aumentar la proporción de excipiente en la dispersión sólida, es posible distinguir la presencia de una matriz de maltodextrina de elevado tamaño (5-20 μm). Las pequeñas partículas que se observan en su superficie tienen una morfología lisa sin apariencia cristalina, que podemos atribuir a las partículas de maltodextrina de menor tamaño (2-5 μm). En estas estructuras no es posible apreciar la presencia de pequeños cristales de nistatina, los que, posiblemente, se encuentren atrapados en el interior de la matriz de maltodextrinas.

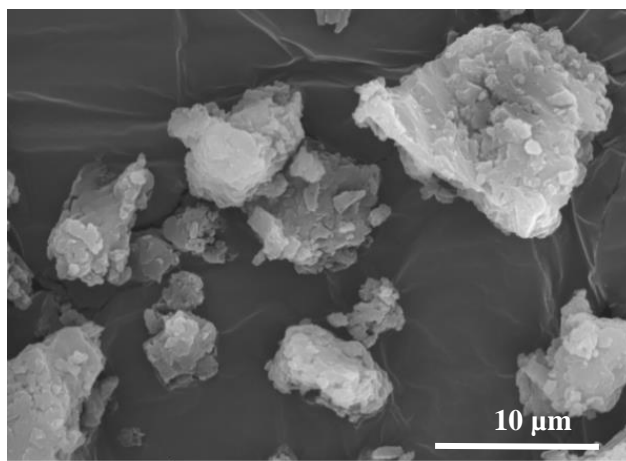


Fig. 37. Microfotografía de dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:4 (3000x).

La dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 aparece recogida en la figura 38, en la cual es posible observar la estructura matricial de la maltodextrina de elevado tamaño (5-20 μm) formada durante el proceso de secado del sistema. Esta estructura presenta pequeñas partículas de maltodextrina (2-5 μm) en superficie, identificables por su morfología de escamas lisas. No es posible observar los pequeños cristales de nistatina. En la figura 39, se observa la presencia de distintos aglomerados de maltodextrina de gran tamaño (5-20 μm), destacando la aparición de algún pequeño cristal de nistatina en la superficie del aglomerado, situado en la parte superior derecha, diferenciable por su mayor brillo frente al haz de electrones.

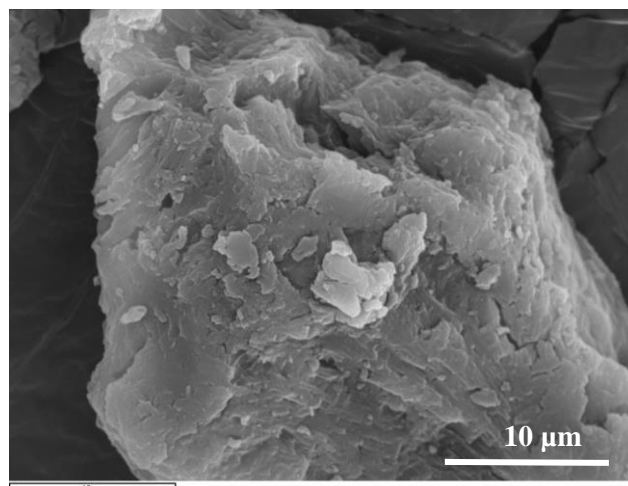


Fig. 38. Microfotografía de dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 (3000x).

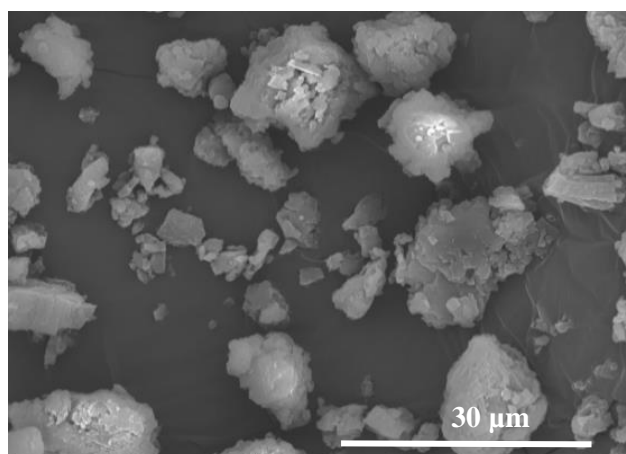


Fig. 39. Microfotografía de dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 (1500x).

Por último, la figura 40 recoge la dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:8. En esta imagen, sólo es posible observar la estructura matricial formada por las partículas de maltodextrinas durante el proceso de secado de la dispersión sólida. Las pequeñas partículas de maltodextrina (2-5 µm) en su superficie son identificables por su morfología de escamas lisas. En la figura 41, se observa la aproximación a una matriz de maltodextrina donde es posible observar, en el ángulo superior derecho, la presencia de un cristal

ortorrómbico de nistatina de unos 3 μm de longitud, atrapado en el interior de la matriz de excipiente.

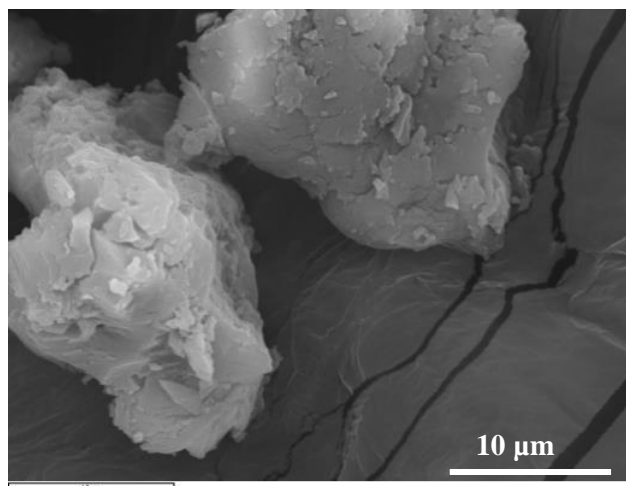


Fig. 40. Microfotografía de dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:8 (3000x).

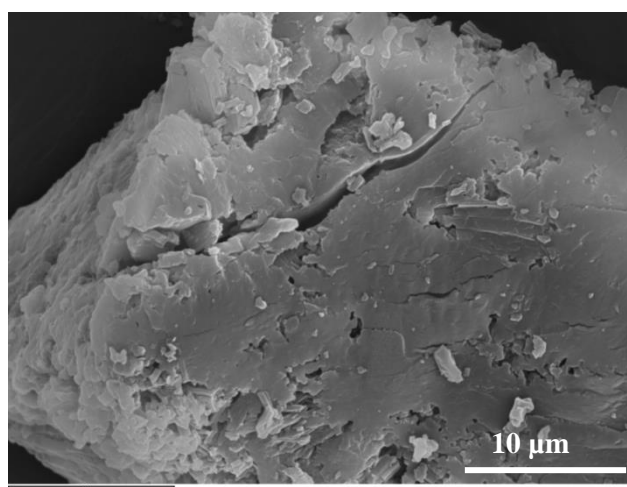


Fig. 41. Microfotografía de dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:8 (3000x).

5.3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los termogramas de DSC se realizaron usando la misma técnica y aparataje que los descritos en el capítulo 4.4.3. Se usó como calibración un estándar de Indio con un punto de transición a 156,6°C. Las muestras, pesadas con precisión, se sellaron herméticamente en cápsulas de aluminio y se

calentaron entre 50°C - 240°C con una tasa de calentamiento de 10°C/min bajo corriente de nitrógeno a 20 ml/min, garantizando así el aumento homogéneo de la temperatura a lo largo de todo el periodo. Se utilizó como control una cápsula vacía, sellada de igual forma, validando así la realización del ensayo.

La figura 42 contiene las representaciones gráficas de los datos de calorimetría de nistatina pura (figura 42a), la mezcla física de Nistatina: Maltodextrina 1:4 (v/v) (MF-N:MD [1:4]) (figura 42b), 1:6 (v/v) (MF-N:MD [1:6]) (figura 42c) y 1:8 (v/v) (MF-N:MD [1:8]) (figura 42d) y las dispersiones sólidas de nistatina y maltodextrinas en proporción 1:4 (v/v) (DS-N:MD [1:4]) (figura 42e), 1:6 (v/v) (DS-N:MD [1:6]) (figura 42f) y 1:8 (v/v) (DS-N:MD [1:8]) (figura 42g). También se incluyó el termograma de maltodextrina como excipiente puro (figura 42h).

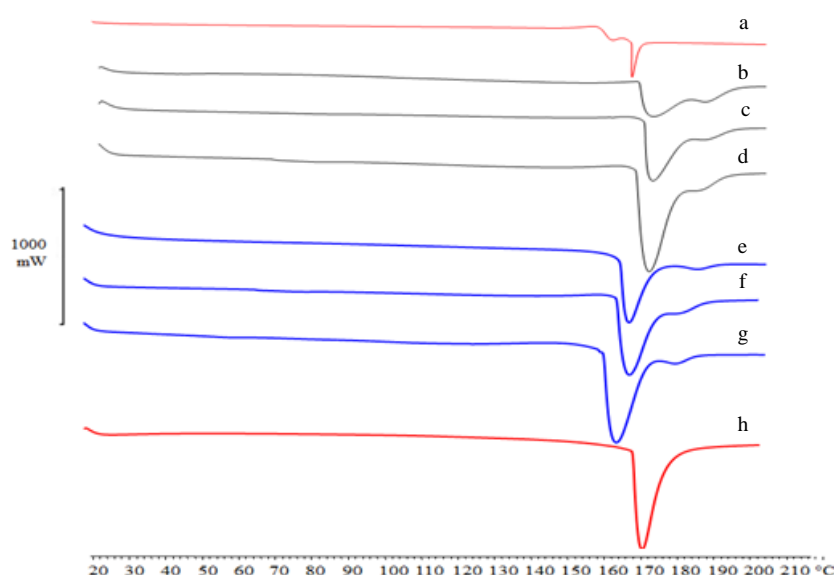


Fig. 42. Representación de los termogramas de DSC de nistatina pura (a), MF-N:MD [1:4] (b), MF-N:MD [1:6] (c) y MF-N:MD [1:8] (d), DS-N:MD [1:4] (e), DS-N:MD [1:6] (f) y DS-N:MD [1:8] (g) y maltodextrina excipiente (h).

Se pueden observar claras diferencias entre el pequeño pico endotérmico de nistatina a 170,65°C, indicativo de baja cristalinidad y con una entalpia de -111,85 J/g y el perfil de la maltodextrina que presenta un elevado pico a 167,30°C con cristalinidades diez veces mayores de los valores de nistatina (-1272,59 J/g).

En las mezclas físicas, se observa una interacción entre ambos picos, produciéndose un desplazamiento de la temperatura a valores superiores con respecto a nistatina. Así, las mezclas físicas MF-N:MD [1:4], MF-N:MD [1:6] y

MF-N:MD [1:8] no muestran desplazamientos del pico correspondiente a maltodextrinas con temperaturas de fusión de 161,30°C, 163,43 °C y 164,01 °C, respectivamente. Sin embargo, aparece un segundo pico a 175,69°C (MF-N:MD [1:4]), 177,87°C (MF-N:MD [1:6]) y 174,84 °C (MF-N:MD [1:8]). El descenso observado en el tamaño de este segundo pico endotérmico con el aumento de la cantidad de maltodextrina en la formulación indica que posiblemente se deba a una interacción de la parte cristalina de nistatina que queda en la formulación con maltodextrina. Este pico se ha observado en otros estudios de DSC de dispersiones sólidas de nistatina con otros azúcares (Arch Sakeer, K. et al, 2010).

Las dispersiones sólidas muestran una menor interacción entre la maltodextrina y la nistatina, presentando un descenso en las temperaturas de fusión de la maltodextrina, con valores de 155,86 °C (DS-N:MD [1:4]), 156,73°C (DS-N:MD [1:6]) y 154, 92°C (DS-N:MD [1:8]), mientras que permanecen constantes los valores de temperatura de fusión de la nistatina con valores de 176,21 °C (DS-N:MD [1:4]), 175,85°C (DS-N:MD [1:6]) y 174,92°C (DS-N:MD [1:8]). La elevada inclusión de cristales de nistatina en el interior de la matriz de maltodextrina observada en las dispersiones sólidas en proporciones 1:6 y 1:8, hacen que seleccionemos la formulación 1:6 como la mejora candidata para incluir las moléculas de nistatina en el interior del seno del polímero.

5.3.4 Difracción de rayos X (XRPD)

Se empleó el mismo equipo de rayos X que el utilizado en el análisis de difracción de rayos X de polvo, descrito en el capítulo 4.4.4. Utilizando una radiación monocromática CuK ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$), con un voltaje de 30 kV y una corriente de 30 mA. Todas las muestras se miden con ángulos entre 5 y 50° (2 θ), con una velocidad de 0.04° / 1 s.

Los resultados de difracción de rayos X pueden observarse en la figura 43. Dicha figura contiene los datos XRPD de Nistatina (figura 43a) y MD materia prima (figura 43j), la mezcla física de ambos en proporción 1:1 (v/v) (MF-N:MD [1:1]) (figura 43b), 1:4 (v/v) (MF-N:MD [1:4]) (figura 43c), 1:6 (v/v) (MF-

N:MD [1:6]) (figura 43d) y 1:8 (v/v) (MF -N:MD [1:8]) (figura 43e) y las dispersiones sólidas de nistatina y maltodextrinas en proporción 1:1 (v/v) (DS-N:MD [1:1]) (figura 43f), 1:4 (v/v) (DS-N:MD [1:4]) (figura 43g), 1:6 (v/v) (DS-N:MD [1:6]) (figura 43h) y 1:8 (v/v) (DS-N:MD [1:8]) (figura 43i).

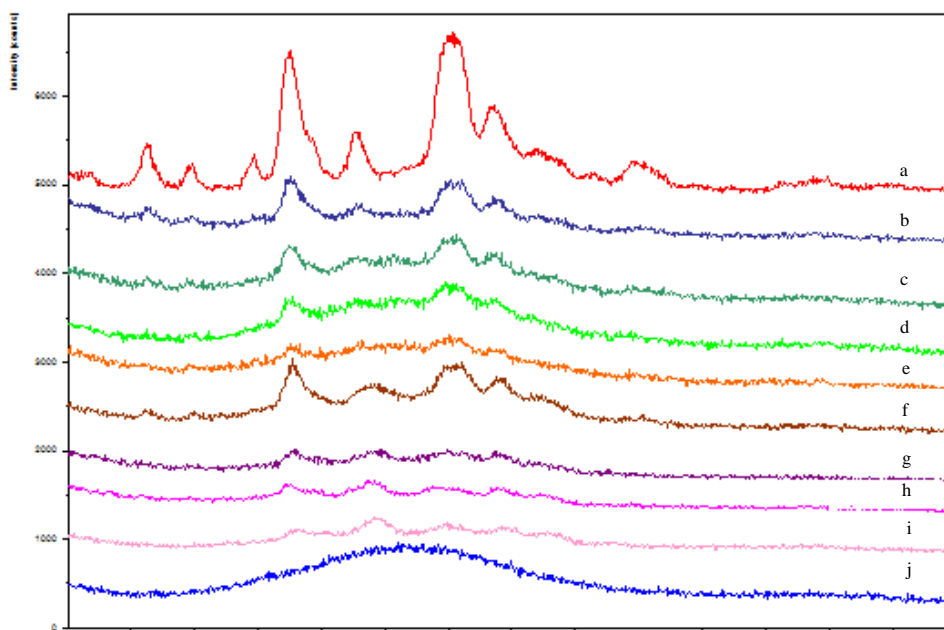


Fig. 43. Resultados de difracción de rayos X en polvo de: nistatina material prima (a), MF-N:MD [1:1] (b), MF-N:MD [1:4] (c), MF-N:MD [1:6] (d), MF-N:MD [1:8] (e), DS-N:MD [1:1] (f), DS-N:MD [1:4] (g), DS-N:MD [1:6] (h), DS-N:MD [1:8] (i) y Maltodextrina como excipiente puro (j)

Los resultados de nistatina (figura 43a) ponen de manifiesto la presencia de picos relacionados con patrones cristalinos. Se perciben claramente los picos mayoritarios a 8°, 14°, 16,5° y 20,5° 2θ (Park, JB. et al, 2015) característicos de este antifúngico, como se pudo comprobar en el capítulo 4.4.4.

La distribución de maltodextrina (figura 43j) se traduce en un compuesto amorfo de cristalinidad muy baja sin apenas picos visibles. La baja cristalinidad de este excipiente explica la reducción de la cristalinidad de las mezclas físicas entre maltodextrinas y nistatina. Se representan los picos de mezclas físicas en proporción MF-N-MD [1:1] (figura 43b), MF-N-MD [1:4] (figura 43c), MF-N-

MD [1:6] (figura 43d) y MF-N-MD [1:8] (figura 43e). En todas las mezclas físicas hay una reducción de la cristalinidad de nistatina, aunque aún se pueden percibir los picos característicos del antifúngico. A proporciones altas de maltodextrinas, dichos picos aparecen atenuados y casi imperceptibles. Se reducen significativamente la intensidad de los picos más representativos de nistatina tanto en la formulación MF-N-MD [1:6] (figura 43d) como en la MF-N-MD [1:8] (figura 43e). Esta última presenta un perfil calorimétrico muy próximo al de maltodextrina.

La intensidad de los picos de nistatina aparece aún más reducida en las dispersiones sólidas. Se perciben aun claramente en la dispersión sólida de proporción DS-N-MD [1:1] (figura 43f) como consecuencia de la cristalinidad de nistatina y sus dos picos más representativos a 14° y $20,5^\circ$ 2θ (Vippagunta, SR. et al, 2002). Los picos se atenúan considerablemente a medida que la proporción de maltodextrina aumenta en las formulaciones DS-N-MD [1:4] (figura 43g), DS-N-MD [1:6] (figura 43h) y DS-N-MD [1:8] (figura 43i), adquiriéndose una representación de una sustancia casi amorfa con una intensidad muy baja. Estos resultados se relacionan con la reducción de la cristalinidad de compuestos altamente cristalinos, como el caso de nistatina, tras someterse a procesos de formación de dispersiones sólidas por medio de técnicas de evaporación del solvente, en procesos de congelación y secado o de disolución y secado al vacío (Leonardi, D. et al, 2007).

5.4 Ensayos microbiológicos

5.4.1 Ensayo *in vitro* de actividad antifúngica

El estudio de la actividad antifúngica en placa se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 4.3.5, basado en las técnicas de difusión en placa de agar (Jorgensen, JH. et al, 1999). Se prepararon placas de agar Mueller-Hinton mediante la técnica que se desarrolló en el apartado 4.3.5.1. Una vez solidificado el agar, se colocaron discos previamente impregnados durante 15 minutos, en condiciones de esterilidad, con 20 μ l de una suspensión acuosa que contenía la dispersión sólida de nistatina y maltodextrina 1:6 a concentración de 15 mg/ml (DS-N:MD [1:6]) y una suspensión acuosa de nistatina a la misma

concentración que la dispersión sólida. Se introdujeron las placas con los discos en nevera durante 2 horas, con el fin de homogeneizar las formulaciones en los discos, y se llevaron a una estufa calefactora a 37 °C durante 24 horas. Se cultivaron discos de control negativo que contenían una solución acuosa de maltodextrinas. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, cultivando los discos en placas distintas.

Al igual que en los estudios microbiológicos de actividad antifúngica en placa realizados con los sistemas micelares (ver capítulos 4.3.5 y 4.5.1) los resultados obtenidos de los halos de inhibición fueron medidos con un calibre de precisión. La tabla 13 recoge los resultados obtenidos de las dos formulaciones ensayadas a las 24 y a las 72 horas. La dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:5 obtuvo un halo de inhibición de más de 28 mm ($28,11 \pm 0,37$ mm) tras 24 horas de cultivo. Este resultado es significativamente relevante ($p < 0,001$) al compararlo con el valor del halo de inhibición obtenido tras el cultivo de la suspensión acuosa, que fue de $20,84 \pm 0,53$ mm. Ambos valores se reducen después de 72 horas de cultivo. Las reducciones en ambos casos son del mismo orden.

Tabla 13. Ensayo de difusión en disco para actividad antifúngica contra *Candida albicans* CECT 1394

Muestra	Halo de inhibición 24 h (mm)	Halo de inhibición 72 h (mm)
Blanco	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$
Control	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$
Suspensión acuosa	$20,84 \pm 0,51$	$19,15 \pm 0,53$
DS-N:MD [1:6]	$28,11 \pm 0,36$ *	$27,35 \pm 0,09$ *

* $p < 0,001$ de la DS-N:MD (1:6) comparada con la suspensión acuosa

5.4.2 Ensayo *in vitro* de prevención de la formación de biopelículas

Se realizó el estudio de la actividad preventiva de la formación de biopelículas de *C. albicans* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.5.2.1. Se utilizaron dispositivos de uso clínico (sonda endotraqueal) que fueron puestos en contacto con las formulaciones a evaluar durante un periodo de 3 minutos, ya que se estimó dicho tiempo como la duración de un enjuague o lavado del material. Como se ha descrito previamente, la disminución en el número de unidades formadoras de colonias, tras el cultivo de las muestras, implicará actividad preventiva de la formación de biopelículas. La correcta

formación de la biopelícula sobre la superficie del dispositivo se determinó mediante el cultivo de piezas del material que no estuvieron en contacto con formulaciones activas. Se ensayó, además, una placa de control negativo que contenía soluciones no contaminadas.

El ensayo se desarrolló comparando la actividad preventiva de la formación de biopelículas de una suspensión acuosa de nistatina y de una dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 (DS-N:MD [1:6]). Para poder realizar el “enjuague” de las piezas del dispositivo clínico, se suspendió la cantidad de polvo necesaria de ambas formulaciones en un volumen determinado de agua para obtener una concentración de nistatina de 15 mg/ml.

La tabla 14 recoge los resultados obtenidos en el ensayo. La formación de la biopelícula fue revelada tras el cultivo de la placa con las piezas de material que no fueron puestas en contacto con las formulaciones activas. Así, se contabilizaron una cantidad media de alrededor de 143 UFC/cm². Las muestras que contenían disolventes no contaminados no tuvieron crecimiento alguno de UFC.

La administración de las formulaciones ensayadas en la superficie del dispositivo clínico redujo en ambos casos la formación de la biopelícula sobre el mismo. La suspensión acuosa de nistatina fue capaz de reducir la adherencia y agregación de colonias fúngicas en alrededor de un 20%, dato con diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0,001$). La cristalinidad de la nistatina en suspensión acuosa y su elevada hidrofobicidad impiden un aumento mayor de la actividad preventiva de la formación de biopelículas. La dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 (DS-N:MD [1:6]), en cambio, sí fue capaz de reducir de forma intensa la adherencia del hongo a la superficie del material y la subsiguiente formación de la biopelícula. En concreto el porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas estuvo por encima del 83% ($p = 0,0002$). Esta significativa reducción frente a la suspensión de nistatina empleada como referencia, puede explicarse por varios factores: por un lado, la reducción del tamaño de partícula, como quedó demostrado en las microfotografías de microscopía electrónica (SEM); además, cabe destacar el aumento de la solubilidad y la reducción de la cristalinidad de las moléculas de nistatina, como se ha podido comprobar en los ensayos de DSC y XRPD; y a esto se añade la existencia de un efecto del propio excipiente, ya

que las maltodextrinas *per se* aumentan el efecto osmótico de la formulación desestabilizando la estructura de la biopelícula (Sultana, ST. et al, 2016). Este efecto sinérgico ha sido puesto de manifiesto en investigaciones que utilizaban vancomicina y maltodextrina para el tratamiento de biopelículas de *Staphylococcus aureus* (Kiamco, MM. et al, 2015).

Tabla 14. Efecto preventivo de la adhesión y la formación de biopelículas de *C.albicans* CETC 1394

	UFC/cm ² ± SD	Adhesión (%)	p-valor vs. control
Control	143,75 ± 10,6	100,0	---
Suspensión acuosa	112,5 ± 10,35	78,26	p<0,001
DS-N:MD [1:6]	23,75 ± 7,44	16,52	p<0,001

* p < 0,001 de la DS-N:MD (1:6) comparada con la suspensión acuosa

5.5 Ensayo *in vitro* de cesión en aparato de disolución

El ensayo de disolución es una técnica analítica de uso muy frecuente en un laboratorio farmacéutico. Normalmente, es útil para evaluar “*in vitro*” el comportamiento de un principio activo en una forma farmacéutica de administración generalmente oral. Además, este ensayo permite evaluar las formas farmacéuticas durante su desarrollo, valorar su estabilidad y determinar el porcentaje de cesión a unos tiempos determinados (Chow Chan, C. et al, 2004).

La real farmacopea española (RFA) (AEMPS, 2015) recoge que para los estudios de cesión se realicen con el aparato 2 colocando la forma farmacéutica en la parte inferior del vaso, antes de que comience a rotar la paleta. El objetivo de la aplicación de un ensayo de disolución a nuestra formulación es la simulación de un movimiento bucal al realizar un enjuague y comprobar si los resultados obtenidos en SEM, DSC y XRPD se correlacionan con una mejora de la solubilidad acuosa de la formulación. Esta mejoría ha sido demostrada en estudios recientes con principios activos de solubilidad comprometida al formularse como dispersiones sólidas (Tayyab Ansari, M. et al, 2018).

5.5.1 Desarrollo del ensayo de cesión en aparato de disolución

Utilizando el sistema de paletas (aparato 2 de RFE) (AEMPS, 2015), diseñamos un ensayo para determinar los porcentajes de cesión de la nistatina desde las dispersiones sólidas.

Se elabora una formulación de acción local en la cavidad bucal mediante un gel de elevada viscosidad que permita incluir la nistatina materia prima o las distintas dispersiones sólidas. La elección del polímero conformador del gel se basó en estudios de preformulación realizados con geles de nistatina (Llabot, JM. et al, 2007). Así, a tenor de los resultados obtenidos en dichos estudios se decidió utilizar carboximetilcelulosa sódica al permitir obtener geles de facilidad de manejo con un alto poder de adhesión y que facilitaría su permanencia en cavidad orofaríngea o en la superficie del material de uso clínico.

5.5.1.1 Carboximetilcelulosa (carmelosa sódica, carboximetil éter de celulosa sal sódica, o glicolato de celulosa sódica o NaCMC, CMCS ó E466):

La carboximetilcelulosa se presenta como polvo granuloso, blanco o casi blanco, higroscópico tras desecación. Prácticamente insoluble en acetona, en etanol al 96%, y en tolueno; es fácilmente dispersable en agua originando soluciones coloidales. Adquiere coloración oscura a partir de 227°C y funde a temperaturas cercanas a los 252°C (Rowe, R. et al, 2009).

Estructura química: es la sal sódica de un éter policarboximetílico de la celulosa

Usos: es un coloide hidrófilo de acción con mayor poder adhesivo que otros derivados celulósicos (como metilcelulosa), siendo ideal como excipiente semisólido bucal. Admite un contenido de hasta un 20% de alcohol y precipita con cationes trivalentes. En industria farmacéutica se utiliza como emulsificante en emulsiones O/W (aunque es menos efectiva que la metilcelulosa), como agente suspensor (de sustancias insolubles en agua), dispersante (cuando aparecen precipitados), o disgregante en comprimidos. Se emplea también en la protección mecánica de lesiones orales y periorales formando parte de excipientes

como el orabase, y como sustituto de la saliva fisiológica en xerostomía (sequedad de boca). (Acofarma, Ficha técnica carboximetilcelulosa). Presenta un perfil muy prometedor en investigación ya que ciertas modificaciones estructurales han demostrado *in vitro* actividad antimicrobiana y antitumoral (Basta, AH. et al, 2016).

5.5.2 Procedimiento general de preparación de la formulación para el estudio de cesión.

Se preparó un gel de CMC al 1,5 % siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- En balanza de precisión se pesa la cantidad adecuada de principio activo.
- Se incluye en matraz aforado y se adiciona el volumen de agua necesario para obtener una concentración de 15mg/ml de nistatina.
- La suspensión obtenida se lleva a agitación constante en agitador magnético.
- Sobre la misma se añade lentamente la cantidad adecuada de CMC para obtener un gel al 1,5%.
- El proceso puede acelerarse calentando la suspensión, siempre a temperatura no superior a 50°C.

Con este procedimiento se obtiene un gel de elevada viscosidad. Esto permite incluir una cantidad exactamente pesada en una celda de liberación descritos en la RFE para los estudios de disolución de preparados semisólidos y que se coloca en el fondo de los vasos del aparato de disolución.

El ensayo se realizó utilizando dos formulaciones: un gel de CMC al 1,5% de nistatina materia prima a una concentración de 15mg/ml y un gel de CMC al 1,5% de la dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 (DS-N:MD [1:6]) a idéntica concentración. Se aplicó el procedimiento general para la obtención de los geles. El gel de nistatina materia prima (CMC-Nyst) presentó una coloración amarillo anaranjada con aglomeraciones heterogéneas de nistatina que no se incluyeron totalmente en la matriz del gel (figura 44). Estas aglomeraciones precipitan, apareciendo una cantidad considerable de restos de nistatina a partir de las 24 horas.

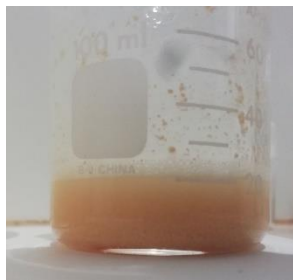


Fig. 44. Gel de carboximetilcelulosa 1,5% de nistatina a concentración de 15mg/ml

El gel de la dispersión sólida (CMC-DS) presentó una coloración amarilla pálida, con una coloración y aspecto homogéneo (figura 45). Además, la estabilidad del gel es mucho más elevada, manteniéndose la homogeneidad por encima de los 7 días, sin que aparezcan precipitados de principio activo.

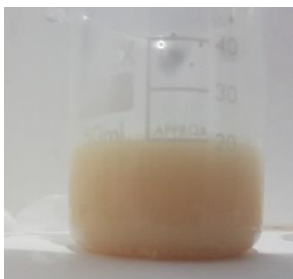


Fig. 45. Gel de carboximetilcelulosa 1,5% de dispersión sólida de nistatina y maltodextrina 1:6 a concentración de 15mg/ml

5.5.3 Procedimiento para cesión en aparato de disolución:

El ensayo de cesión en aparato de disolución se llevó a cabo con el fin de valorar la cantidad de principio activo que permanece en la celda de cesión al final del ensayo. La metodología del ensayo de cesión se ha basado en estudios *in vitro* de liberación de compuestos antifúngicos a partir de geles con polímeros de celulosa de características similares a nuestra formulación experimental (Kong, EF. et al, 2015). Para realizar este ensayo, se llenaron los vasos del aparato de disolución con 900 ml de agua purificada y fueron atemperados a una temperatura de 37°C mediante un baño termostatzado. Se realizó el estudio sobre 8 muestras de gel de CMC con las formulaciones de nistatina para cada una de las formulaciones estudiadas. Tras la preparación de las formulaciones en gel (ver apartado 5.5.2), se dispusieron 2,4 ml mediante una jeringa estéril sobre el contenedor de las celdas de cesión y fueron tapadas con una rejilla metálica de luz de malla de 0,5 mm. Las celdas fueron introducidas en los vasos del aparato de disolución y se tomó una primera alícuota de 5 ml de cada uno de los vasos para

determinar la cantidad de nistatina a tiempo cero (blanco de cada vaso), reponiéndose el mismo volumen con agua purificada en cada vaso. El volumen extraído fue filtrado por microfiltro de luz de malla de 0,45 μm , y se introdujo en un tubo de ensayo. Estas muestras se leen directamente en el espectrofotómetro, para determinar la cantidad de nistatina cedida al vaso (ver apartado 5.5.4.4)

El ensayo se inició ajustando la velocidad de las paletas a 18 rpm a 13 cm de la celda de cesión. Estudios previos realizados con distancias inferiores mostraron liberaciones completas excesivamente rápidas (menor de 15 min). Los tiempos para los distintos ensayos de liberación fueron 15, 30, 45, 60 y 120 min. Al final del estudio se extrajeron las 8 celdas de cesión de los vasos y se realizaron tres lavados con 5 ml de agua purificada sobre el contenedor de la celda, recogiendo el líquido resultante del lavado en tubos de ensayo para la valoración de la cantidad de nistatina retenida en cada celda de cesión.

5.5.4 Análisis de nistatina por espectrofotometría UV/Vis

La determinación mediante espectrofotometría UV/Vis de la cantidad de nistatina presente en una muestra ha sido validada frente a una nistatina materia prima. Estos estudios se realizan siguiendo los métodos descritos por otros autores (de Aguiar, MM. et al, 2010).

5.5.4.1 Selección de la longitud de onda:

El análisis se realizó utilizando un espectrofotómetro UV/V marca Jasco. El barrido espectrofotométrico mostró la presencia de tres intensas bandas de absorción ultravioleta de nistatina a 291 nm, 306 nm y 321 nm, como puede comprobarse en la figura 46. Estos datos se correlacionan con resultados de investigaciones previas (Silva, L. et al, 2003; y Lescano, GM. et al, 2014). Conviene resaltar que la nistatina es un principio activo que sufre fotodegradación, y que la presencia de longitudes de onda por encima de $\lambda=366$ nm la descomponen en subproductos con menor actividad (Hemmateenejad, B. et al, 2014).

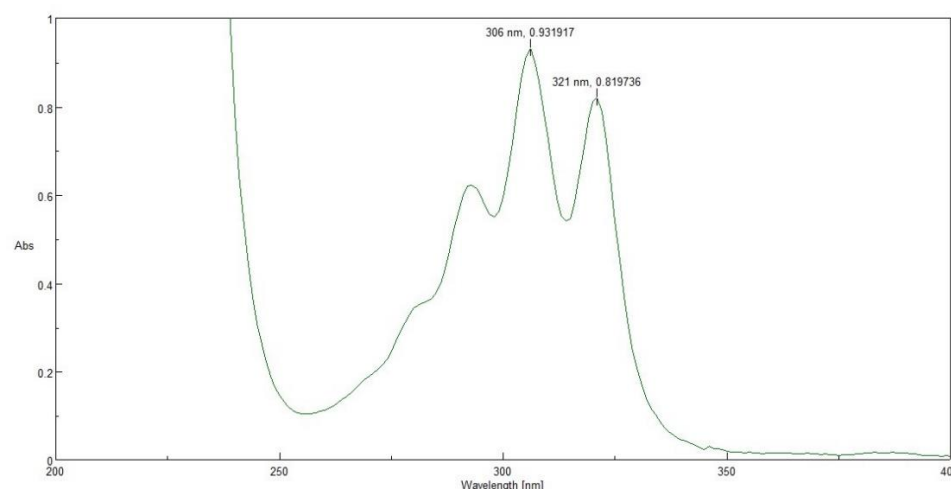


Fig. 46. Barrido UV/Vis de nistatina

Por ello, y basándonos en la λ máxima utilizada en estudios previos de espectrofotometría UV/Vis de nistatina (Tallury, P. et al, 2007) y en las especificaciones de la Real Farmacopea Española (AEMPS, 2015) para los análisis de Nistatina, decidimos utilizar una longitud de onda de $\lambda=306$ nm, a la que nistatina presenta su pico máximo de absorción en el espectro UV/VIS.

5.5.4.2 Obtención de las muestras.

Las muestras de 5 ml una vez filtradas ($0.45 \mu\text{m}$), obtenidas para cada tiempo fueron determinadas por lectura en el espectrofotómetro UV/Vis a $\lambda = 306$ nm.

Los volúmenes resultantes de los lavados de las celdas de cesión fueron introducidos en tubos falcon estériles de 50 ml de volumen y se centrifugaron en una centrífuga Hettich D-78532 a 5000 rpm durante 10 minutos. Así, se consigue la separación de los precipitados de nistatina o dispersión sólida de un sobrenadante en el que el principio activo se encuentra disuelto (figura 47). Se extrajeron 5 ml de dicho sobrenadante procediéndose a la extracción de nistatina precipitada, mediante la adición de 2,5 ml de DMAc, agitando a 2000 rpm 2 min, centrifugando a 5000 rpm durante 10 minutos y extrayendo el sobrenadante en un tubo de ensayo. Se realiza una segunda extracción para garantizar la recuperación de toda la nistatina de cada formulación ensayada. Las muestras recogidas fueron filtradas por filtro de $0,45 \mu\text{m}$ y se determinaron sus concentraciones mediante lecturas a $\lambda= 306$ nm en el espectrofotómetro.

DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

Estudios previos han destacado la utilidad del análisis por espectrofotometría UV/Vis para la evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans* de sistemas transportadores de nistatina de liberación controlada (Pupe, GC. et al, 2011).

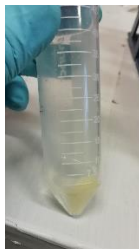


Fig. 47. Sobrenadante y precipitado de nistatina tras centrifugación.

Los análisis se realizaron en 8 muestras para cada tiempo de ensayo y se aplicó la recta de calibrado (capítulo 5.6.4.3) a determinar tanto la cantidad de nistatina liberada por el gel, como aquella que permanece en el interior de la celda de cesión.

5.5.4.3 Obtención de la recta de calibrado

Se estableció la correlación entre la concentración de nistatina liberada y la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro mediante una recta de calibrado de nistatina en agua a un rango de concentraciones de 1-15 mg/ml como puede verse en la figura 48. De esa recta, se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 0,0647x - 0,0002$ $R^2 = 0,9985$

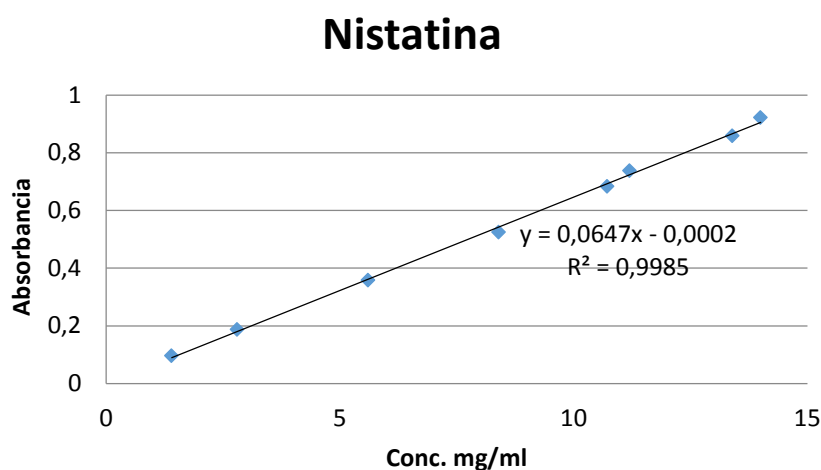


Fig. 48. Recta de calibrado de nistatina en agua.

Aplicando la ecuación obtenida en la recta de calibrado, pudimos determinar la cantidad de nistatina que se liberó al líquido de los vasos del aparato de disolución y la que permanece en la celda de cesión a partir de la absorbancia generada por cada muestra.

5.5.4.4 Resultados

La tabla 15 recoge la cantidad de nistatina liberada a partir de la celda de cesión en los ensayos a tiempo 15, 30, 45, 60 y 120 minutos, calculada como media y desviación estándar de las 8 muestras. La presencia de nistatina en esta muestra inicial es debida al inicio de la cesión a partir del gel de CMC contenido en las celdas en todos los vasos del aparato de disolución cuando el ensayo se encuentra parado. La cantidad de nistatina cedida es muy baja en ambos casos. Sí que se observan diferencias importantes entre los valores de nistatina cedida a partir de la suspensión acuosa gelificada y los del gel de la dispersión sólida. La inclusión de las partículas del principio activo en la matriz de carboximetilcelulosa sódica de la suspensión acuosa es menor debido al mayor tamaño de partícula de nistatina, lo que impide que se liberen al medio a la misma velocidad que las partículas de nistatina de la dispersión sólida. Los valores de nistatina cedida a partir de la dispersión sólida son más altos a todos los tiempos del ensayo, si bien a tiempos bajos (15 min) la cantidad de nistatina liberada presenta unos valores muy próximos a los de la suspensión acuosa.

Tiempo (min)	Cantidad de nistatina (mg)	
	Gel CMC 1,5% suspensión acuosa	Gel CMC 1,5% dispersión sólida
0	0,16 ± 0,002	0,15 ± 0,002
15	3,36 ± 0,03	3,93 ± 0,035
30	6,78 ± 0,031	9,77 ± 0,103
45	10,29 ± 0,058	15,05 ± 0,026
60	15,06 ± 0,045	20,97 ± 0,14

120	$21,40 \pm 0,046$	$30,36 \pm 0,036$
-----	-------------------	-------------------

Tabla 15. Cantidad de Nistatina liberada al medio a partir de la celda de cesión

La liberación de nistatina a partir de un film adhesivo para uso dental ha demostrado seguir un patrón de liberación sostenida, aumentando hasta 5 veces la inhibición de la adhesión de *Candida albicans* a células de mamíferos (Park, JB. et al, 2015). Perfiles de liberación similares han sido descritos en ensayos con clorhexidina formulada en parches de liberación orofaríngea utilizando una matriz polisacáridica de *Psyllium*. (Cavallari, C. et al, 2015). Los parches, elaborados siguiendo el método de evaporación del solvente, fueron comparados con polímeros como carboximetilcelulosa o hidroxipropilcelulosa.

Estudios previos han demostrado que el perfil de liberación orofaríngea de nistatina a partir de una pasta utilizada en la descontaminación de la cavidad oral se asemeja a una liberación controlada (Rood, J. et al, 2015). De hecho, los autores concluyen en que nistatina debería remplazar a anfotericina B, ya que señalan la mayor facilidad que presentan estos sistemas de nistatina comparado con las formulaciones de anfotericina B en la administración en pacientes.

La nistatina que permanece en la celda de cesión se determinó mediante la aplicación de la ecuación de la recta de calibrado tras los lavados de la celda de cesión (ver apartado 5.6.4.3) y las sucesivas extracciones con DMAc de la nistatina precipitada. La tabla 16 recoge la cantidad de nistatina retenida en el gel para cada tiempo de ensayo. Los resultados aparecen expresados en la tabla como porcentaje y desviación estándar de la media de los datos obtenidos con los lavados y las extracciones de las 8 muestras. Los datos de cantidad de nistatina retenida representados en la tabla 16 corresponden a la suma de las partículas de nistatina que permanecen en la celda de cesión que se han solubilizado o son fácilmente solubilizables mediante el volumen de agua de los lavados, y a la fracción de partículas de nistatina que permanece en estado sólido y precipita durante la centrifugación de los lavados con agua. La cantidad presente en estos precipitados fue extraída con DMAc para su lectura en el espectrofotómetro.

DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

Tabla 16. Cantidad de nistatina retenida en la celda de cesión.

<i>Tiempo (min)</i>	Gel CMC 1,5 % suspensión acuosa	Gel CMC 1,5% dispersión sólida
15	89,08 ± 3,66	86,47 ± 3,32
30	82,3 ± 4,88	67,35 ± 1,8
45	66,24 ± 3,27	53,89 ± 3,62
60	54,19 ± 2,04	39,3 ± 1,66
120	36,06 ± 1,4	12,7 ± 0,54

La figura 49 recoge la representación gráfica de los distintos valores de nistatina retenida en la celda de cesión. Como se puede apreciar, a tiempos cortos de ensayo (por debajo de 15 minutos), los valores de nistatina retenida son similares tanto para la formulación a partir de suspensión acuosa como para la dispersión sólida. Este hecho puede explicarse ya que, a tiempos cortos, presenta una mayor importancia la forma de disgregación y erosión del gel de carboximetilcelulosa, que es igual en ambas formulaciones, que el tamaño de partícula y la solubilidad de las propias moléculas. Así, los grandes agregados de la nistatina que se encuentran en la superficie externa del gel de la suspensión acuosa se liberan rápidamente y no quedan en la parte inferior de la celda, igualándose los valores con los obtenidos para la dispersión sólida. Por ello, se empiezan a observar diferencias importantes entre las dos formulaciones a partir del segundo punto de ensayo (30 minutos), donde ya ha comenzado a adquirir importancia la reducción del tamaño de partícula de nistatina, que, al ser menor en la dispersión sólida, permite que las partículas de nistatina se incorporen al medio acuoso y no queden por efecto de la gravedad en la celda de cesión. La cantidad de nistatina retenida presenta valores mayores en la suspensión acuosa, que además no presenta diferencias importantes hasta alcanzados los 45 minutos de ensayo. Esto se explica por el mayor tamaño de partícula de las moléculas de nistatina incluidas en el gel de carboximetilcelulosa: una vez disgregado el gel, las partículas de nistatina son incapaces de

suspenderse ya que presentan un tamaño muy grande, y quedan en la celda de cesión en estado sólido, precipitando en las distintas extracciones. De hecho, en el caso de la suspensión acuosa, pasados los 60 minutos de ensayo aún se encuentra retenida en la celda de cesión más del 50% de la cantidad total de nistatina. La dispersión sólida, sin embargo, libera el 50% mucho antes, presentando valores de nistatina retenida menores en cualquiera de los tiempos de ensayo. La disgregación del gel liberaría partículas de menor tamaño, que son capaces de solubilizarse o suspenderse en solución, incorporándose al medio acuoso contenido en el vaso del aparato de disolución. Estos datos, se correlacionan con los resultados obtenidos en los ensayos fármaco-tecnológicos de DSC y XRPD (capítulo 5.3), en los que se comprobó el menor tamaño de partícula, la reducción de la cristalinidad y la mayor estabilidad de las moléculas de nistatina en agua en la dispersión sólida y que justificaría su mayor actividad antifúngica y preventiva de la formación de biopelículas (capítulo 5.4).

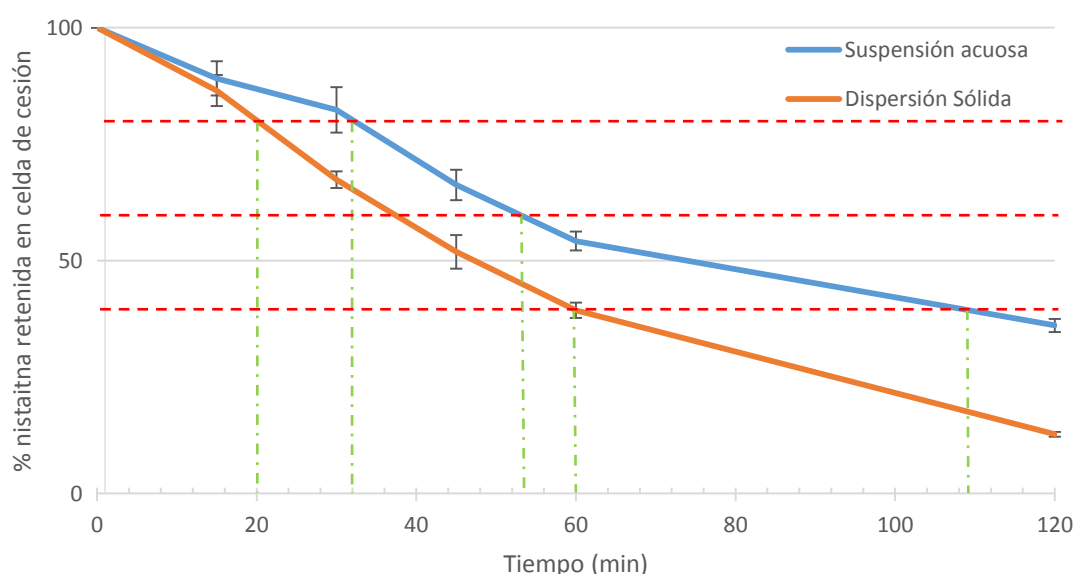


Figura 49. Porcentaje de nistatina retenida in vitro en 8 celdas de cesión a partir de un gel de 1,5% de CMC de dispersión sólida de nistatina a concentración de 15 mg/ml y de una suspensión acuosa de nistatina a 15 mg/ml.

La figura 50 recoge la cantidad de nistatina cedida al medio en las celdas de cesión a cada tiempo de ensayo. Se puede observar que el perfil de liberación presenta una zona de liberación lineal a tiempos elevados en ambos casos (por encima de 60 minutos). Posiblemente, la completa

disgregación y erosión del gel de carboximetilcelulosa esté relacionada con esta linealidad pasados los 60 minutos.

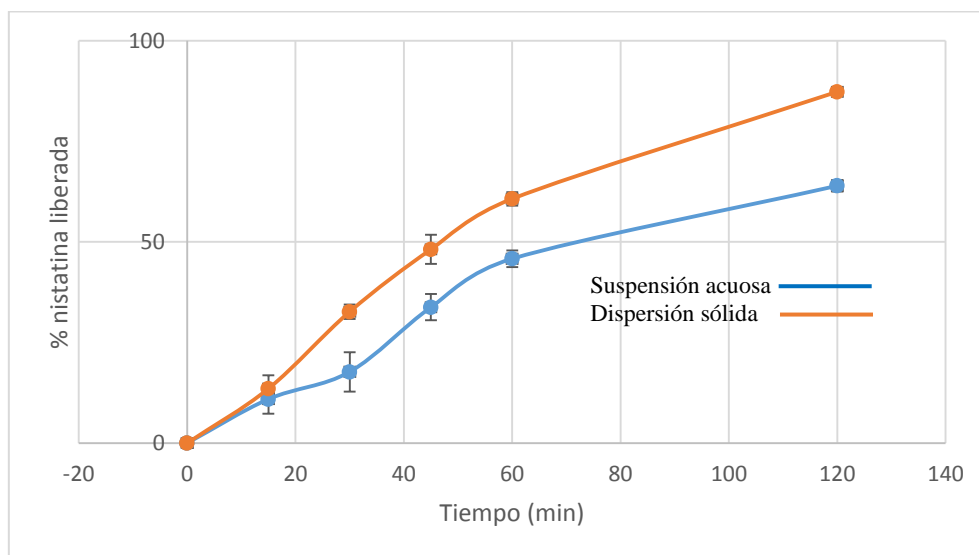


Fig. 50. Porcentaje de nistatina liberada in vitro entre 0 y 120 minutos a partir de geles de carboximetilcelulosa al 1,5% de una dispersión sólida de nistatina 15 mg/ml y de una suspensión acuosa de nistatina a 15 mg/ml.

5.6 Ensayo *in vivo* de cesión de nistatina en cavidad oral

El objetivo de este ensayo es correlacionar la cantidad de nistatina que permanece en la cavidad bucal de voluntarios sanos con los resultados obtenidos en el ensayo de cesión de nistatina en aparato de disolución (apartado 5.5). Estudios similares en voluntarios sanos, se han realizado utilizando comprimidos mucoadhesivos de nistatina (Llabot, JM. et al, 2009).

5.6.1 Desarrollo del ensayo

Se ensayaron las mismas formulaciones que se testaron en el ensayo in vitro: suspensión acuosa y dispersión sólida. Ambas fueron incluidas en un gel de carboximetilcelulosa al 1,5%, idéntico al utilizado en los ensayos anteriores (apartado 5.5.2)

Se seleccionaron 8 voluntarios sanos, obteniéndose 8 muestras de cada tiempo de ensayo. El estudio cumple con la normativa ética y legal para realizar este estudio. Además, los voluntarios han sido adecuadamente informados y han dado su consentimiento para la realización del mismo siguiendo el Real Decreto 223/2004 de Comité Ético de Investigación Clínica. Los voluntarios no podían comer ni beber durante el tiempo de duración del ensayo, para evitar presencia de restos de comida que puedan alterar las muestras.

El procedimiento seguido para la obtención de la cantidad de nistatina en cavidad bucal fue el siguiente:

1. Enjuague de la cavidad bucal de los voluntarios con 5 ml de agua bidestilada durante 1 minuto.
2. Se recogieron esos 5 ml en tubos de ensayo Falcon de 50 ml. Este primer lavado corresponde al blanco de la saliva y/o el estado normal de la cavidad oral de los voluntarios (Blanco).
3. Enjuague con las formulaciones seleccionadas: suspensión acuosa y dispersión sólida. Se realizó un enjuague de la cavidad orofaríngea de los voluntarios con un volumen de 10 ml de formulación a concentración de 15 mg/ml. El tiempo de enjuague fue de 2 minutos. Pasado este tiempo el enjuague es eliminado de la cavidad oral y descartado.
4. Se ensayaron los mismos tiempos que aplicados en el ensayo *in vitro* (capítulo 5.5.3): 0, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Durante estos tiempos, los voluntarios no pueden enjuagarse la boca ni beber ni comer hasta el final del estudio.
5. Una vez concluido el tiempo marcado en el ensayo, se realizaron 3 lavados con 5 ml de agua bidestilada de 1 minuto de tiempo, recogiendo el líquido de lavado resultante en un tubo de ensayo Falcon de 50 ml. Se obtienen así las fracciones de lavado: L1, L2 y L3. Tras el tercer lavado, el ensayo se da por concluido y los voluntarios pueden ingerir líquidos y alimentos de una forma totalmente normal.
6. Las muestras obtenidas de los restos que han permanecido en cavidad oral (L0, L1, L2 y L3) fueron centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos, extrayéndose 5 ml del sobrenadante y redisolviendo, en caso de haberlo, el precipitado del tubo Falcon.
7. Se determinó la absorbancia de dichas muestras con un espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec Shimadzu, Kyoto, Japan a 306 nm de longitud de onda (capítulo 5.5.4.1).
8. Aplicando la ecuación de la recta de calibrado obtenida para el ensayo de cesión *in vitro* (capítulo 5.5.4.3), se obtuvieron los valores de cantidad de nistatina presentes en la cavidad bucal. Los diferentes lavados aplicados a los voluntarios del ensayo sirvieron para conocer la

cantidad de nistatina que queda retenida en la cavidad oral en cada tiempo de estudio. Se restó a cada dato medido la absorbancia obtenida en el blanco de los pacientes (lavado realizado antes del comienzo del ensayo). Este dato se relaciona con el estado de la cavidad oral de los 8 pacientes en estado normal y puede verse afectado por la densidad de la saliva y/o por la presencia de otros componentes (proteínas, restos celulares) en la cavidad oral.

5.6.2 Resultados

5.6.2.1 Caracteres organolépticos:

- Suspensión acuosa: el gel formado presenta una coloración amarillo-anaranjada con agregados de nistatina en su interior, incluso tras la agitación vigorosa en vórtex. La estabilidad de este gel también es limitada: aparece zonas de precipitación de nistatina en el gel a las 24 horas de su formulación. Todos los voluntarios coincidieron en el sabor excesivamente amargo, con textura terrosa que presentaba el gel a partir de la suspensión acuosa. De hecho, ese amargor permanece en la boca y en la cavidad bucal en todos los tiempos del ensayo (120 minutos), haciendo que los tiempos más largos conlleven dificultad para los voluntarios ante la imposibilidad de beber líquido.

- Dispersión sólida: como puede comprobarse en la figura 51, el gel presenta una coloración amarillenta pálida, que se explica por el efecto diluyente de la maltodextrina sobre la nistatina. No se distinguen la presencia de grandes agregados de nistatina y la estabilidad es considerablemente mayor, permaneciendo inalterado y sin la aparición de precipitados a los 6 días de su preparación. La diferencia en el aspecto y estabilidad del gel es consecuencia del aumento de la solubilidad de nistatina y la reducción de su tamaño de partícula, observado en los ensayos de DSC y XRPD, y que justifican la mejoría de la actividad de la formulación. En cuanto al sabor, el característico gusto amargo de la nistatina se ve muy reducido por efecto de la maltodextrina: todo el conjunto de voluntarios aseguró que los enjuagues con la dispersión sólida eran mucho menos desagradables. Este resultado nos permite considerar a esta formulación de maltodextrinas como la formulación

mejor candidata para futuros estudios de palatabilidad en el desarrollo de un enjuague bucal conteniendo nistatina. Estudios de palatabilidad en pastillas conteniendo nistatina mostraron unas buenas perspectivas para el tratamiento de mucositis oral (Silva, FC. et al, 2017).



Fig. 51. Gel de carboximetilcelulosa 1,5 % con dispersión sólida de nistatina a concentración de 15 mg/ml.

5.6.2.2 Nistatina eliminada y retenida en la zona de acción

La tabla 17 recoge el porcentaje de nistatina obtenida en cada uno de los 3 enjuagues de 5 ml de agua destilada de la cavidad bucal para las dos formulaciones estudiadas.

Tabla 17. Porcentaje de nistatina adherida en la mucosa oral arrastrada con los lavados, porcentaje de nistatina total eliminada y porcentaje eliminado por deglución.

<i>Tiempo (min)</i>	Gel 1,5% CMC Suspensión acuosa		Gel 1,5% CMC Dispersión sólida	
	Nistatina adherida (%)	Nistatina eliminada (%)	Nistatina adherida (%)	Nistatina eliminada (%)
0	56,29 ± 0,19	43,71 ± 0,81	69,43 ± 0,42	30,56 ± 0,58
15	45,69 ± 0,13	54,31 ± 0,87	59,46 ± 0,62	40,54 ± 0,38
30	26,99 ± 0,05	73,01 ± 0,95	36,38 ± 0,05	63,62 ± 0,95
60	16,81 ± 0,12	83,19 ± 0,88	21,02 ± 0,31	78,98 ± 0,69
120	3,97 ± 0,03	96,03 ± 0,97	8,19 ± 0,06	91,81 ± 0,94

Como puede observarse, en ningún caso se alcanza el 100 % de nistatina adherida. Este hecho se debe a que una parte considerable de la formulación es desechada tras realizarse dos minutos de enjuague. A tiempo cero de ensayo, se obtuvieron valores diferentes para ambas formulaciones, siendo superiores aquellos obtenidos con la dispersión sólida. La diferencia existente entre estas formulaciones a tiempo cero se debe a la mayor integración de las moléculas de nistatina en la estructura matricial del gel en el caso de la dispersión sólida, debido al tamaño más reducido de las partículas de nistatina, que haría que se eliminase menos cantidad al desecharse el enjuague.

Los valores de nistatina adherida, obtenida tras los lavados, son mayores para la dispersión sólida en todos los tiempos de ensayo, como era de esperar debido al menor tamaño de partícula que presenta la nistatina en esta formulación, como se ha demostrado en los estudios de DSC y XRPD (capítulo 5.3.3 y 5.3.4). Este hecho facilita la inclusión del principio activo en la estructura matricial del gel de carboximetilcelulosa, integrándose más homogéneamente en el mismo, lo que permite su liberación más fácilmente al medio cuando el gel se va erosionando. La suspensión acuosa presenta aglomeraciones importantes de nistatina en suspensión que se liberarían con mayor rapidez o no podrían fijarse mediante el gel a las paredes de la cavidad oral, eliminándose en la fracción de enjuague desechada. A partir de los 15 minutos empiezan a tener efecto la deglución y otros procesos mecánicos de la boca, que erosionarían parcialmente los geles adheridos, haciendo que se pierda nistatina en el tracto digestivo. A tiempos de ensayo mayores (60 minutos o por encima) se tienden a igualar los porcentajes de nistatina recogidos en los lavados, debido a que se han erosionado totalmente los geles y sólo se determina nistatina libre.

La tabla 18 recoge los porcentajes de nistatina adheridos en la cavidad oral tras los enjuagues y muestra los porcentajes de nistatina que se ha eliminado por deglución, en cada tiempo, con respecto a la cantidad de nistatina que se ha fijado inicialmente. También, recoge las concentraciones de nistatina en la cavidad oral para cada tiempo, determinación necesaria para conocer si se han alcanzado las concentraciones mínimas inhibitorias en el tratamiento. Hemos utilizado el volumen medio de la cavidad oral de un adulto, determinado por estudios previos (Ding, X. et al, 2018). Hemos calculado la concentración de nistatina en función de la unidad de superficie de la cavidad bucal de un adulto (cm^2); trabajos anteriores han determinado dicha superficie de aplicación y se estima en 100 cm^2 . (Patel, VF. et al, 2011).

Tabla 18. Nistatina retenida en la cavidad oral

<i>Tiempo (min)</i>	Gel 1,5% CMC Suspensión acuosa			Gel 1,5% CMC Dispersión sólida		
	Nistatina adherida (%)	Nistatina eliminada por deglución (%)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)*	Nistatina adherida (%)	Nistatina eliminada por deglución (%)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)*

DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

0	56,29 ± 0,18	0	15,73 ± 0,49	69,43 ± 0,42	0	19,13 ± 0,86
15	45,69 ± 0,13	18,82 ± 0,05	12,84 ± 0,36	59,46 ± 0,62	14,36 ± 0,19	16,42 ± 1,13
30	26,99 ± 0,05	52,06 ± 0,14	7,73 ± 0,27	36,38 ± 0,04	47,59 ± 0,38	8,76 ± 0,31
60	16,81 ± 0,12	70,15 ± 0,07	4,95 ± 0,3	21,02 ± 0,29	69,71 ± 0,12	5,94 ± 0,72
120	3,96 ± 0,03	92,95 ± 0,15	1,48 ± 0,06	8,18 ± 0,06	88,21 ± 0,36	2,45 ± 0,11

*Concentración determinada por cm² de superficie de la cavidad bucal

Las diferencias en la cesión de nistatina de ambas formulaciones comienzan a observarse a partir de los 15 minutos de ensayo, en donde los valores de nistatina adherida de la suspensión acuosa no llegan al 46%, mientras que los obtenidos en la dispersión sólida se sitúan prácticamente en el 60%. Esta diferencia significativa ($p < 0,001$) entre ambas formulaciones es especialmente importante ya que permite que la dispersión sólida actúe en las paredes de la cavidad oral, a una concentración de nistatina de 16,42 µg/ml, que supera a la concentración mínima inhibitoria para la *Candida albicans* (CMI_s > 4 µg/ml) necesaria para el tratamiento de infecciones de distintas especies de *Candida* y concentraciones superiores a 16 µg/ml, necesarias para el tratamiento preventivo de la formación de biopelículas en distintas especies de *Candida* (Paula, SB. et al, 2015; Queiroz, PA. et al, 2015). Además, estas concentraciones elevadas son especialmente importantes para el tratamiento de las posibles biopelículas de *Candida* que pueden tener los pacientes en la cavidad bucal, necesitándose concentraciones superiores a 16 µg/ml como los obtenidos en nuestros enjuagues para estos tratamientos de biopelículas en la cavidad bucal. (Paula, SB. et al, 2015). La utilización de la nistatina mediante en estos enjuagues muestra una ventaja frente a los antifúngicos como el fluconazol utilizado como profilaxis en enfermos de SIDA o con terapias de inmunodepresión, que presentan habitualmente mucositis asociadas. (Paula, SB. et al, 2015; y Kuhn, DM. et al, 2002).

Estas diferencias se acentúan a medida que aumentan los tiempos de ensayo, obteniéndose unos porcentajes de nistatina adherida para la suspensión acuosa y la dispersión sólida entorno al 27% y 36 % respectivamente a los 30 minutos y alrededor del 17 % y el 21% respectivamente a los 60 minutos, respectivamente. A tiempo final del

ensayo (120 minutos), siguen observándose porcentajes significativamente distintos, alcanzándose porcentajes de nistatina retenida de alrededor del 4% en la suspensión acuosa y superiores al 8% en la dispersión sólida. Estos porcentajes indican que trascurridas las 2h las cantidades de nistatina podrían no ser adecuadas para el tratamiento frente a *Candida albicans* (presentando concentraciones de $1.48 \pm 0,06$ y $2.45 \pm 0,11$ $\mu\text{g/ml}$, para la suspensión de nistatina y la dispersión sólida respectivamente) En todos los casos, la nistatina que no ha quedado adherida ha sido probablemente ingerida por los voluntarios que realizaron el ensayo, con lo que no puede ejercer su acción antifúngica. Por otra parte, si estudiamos las concentraciones de nistatina obtenidas a cada tiempo observamos que las concentraciones de nistatina que permanecen en la cavidad oral muestran diferencias significativas entre ambas formulaciones ($p < 0,001$). Este resultado parece indicar que las formulaciones de maltodextrina presentan mayores concentraciones en la cavidad oral y puede tener un efecto sobre las posibles biopelículas que aparecen en las mucositis orales. Es importante destacar que el gel de suspensión acuosa ($15,73 \pm 0,49$ $\mu\text{g/ml}$) no es capaz de alcanzar la concentración de 16 $\mu\text{g/ml}$ ni siquiera a tiempo cero del ensayo: este dato implica que este gel no sería de utilidad para el tratamiento de biopelículas fúngicas formadas. Para el caso del gel de dispersión sólida, la concentración por encima de 16 $\mu\text{g/ml}$ se mantiene por encima de los 15 minutos tras el enjuague, haciendo que, junto al mantenimiento de la concentración por encima de la CMI de *Candida albicans* hasta casi prácticamente la hora de ensayo ($5,94 \pm 0,72$ $\mu\text{g/ml}$). Este resultado indica que este tratamiento parece ser el más idóneo para infecciones fúngicas con posibilidad de formación de biopelículas. Este resultado es especialmente importante para prevenir o tratar la formación de biopelículas en la cavidad oral, debido a la mayor aparición de estas infecciones en los tratamientos con corticoides, agentes inmunodeprimidos o tratamientos con radioterapia (Kuhn, DM. et al, 2002; Queiroz, PA. et al, 2015; y Hotta, J. et al, 2017).

Los porcentajes eliminados por deglución también presentan diferencias importantes entre ambas formulaciones: la suspensión acuosa es

eliminada en mayor proporción que la dispersión sólida en cualquiera de los tiempos ensayados. Los resultados confirman la hipótesis de que la nistatina está más integrada en el gel para la dispersión sólida lo que le permite fijarse de una forma más eficaz, eliminándose menos cantidad por los movimientos mecánicos y la deglución. Sin embargo, a tiempos superiores a 60 minutos la cantidad eliminada por deglución tiende a igualarse, ya que el gel ha sido totalmente erosionado y no quedan moléculas de nistatina en el interior del seno de la matriz de carboximetilcelulosa.

La curva de eliminación de nistatina puede observarse en la figura 52.

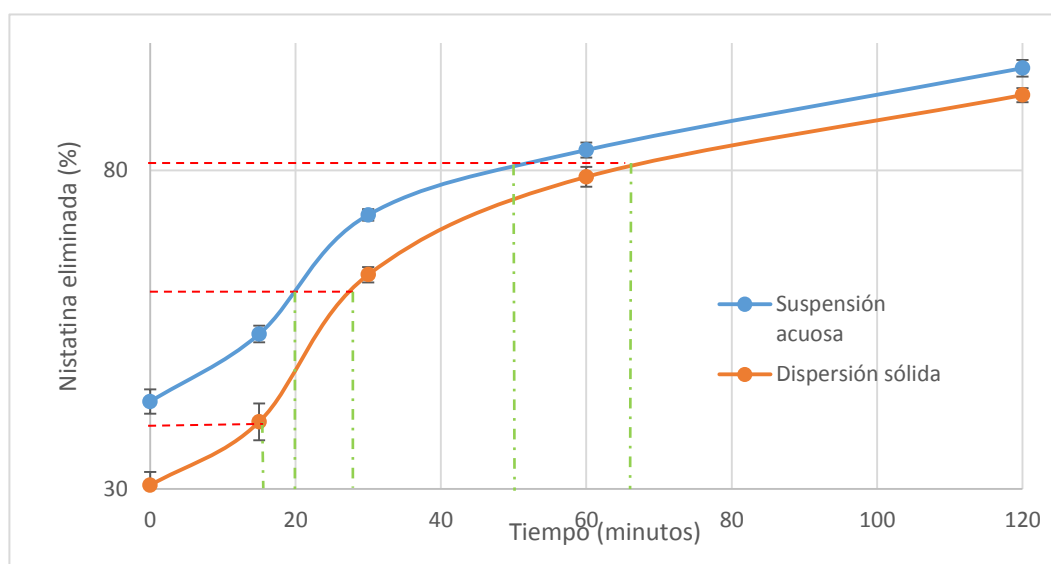


Fig. 52. Porcentaje de nistatina eliminada en 8 voluntarios sanos entre 0 y 120 minutos a partir de geles de carboximetilcelulosa al 1,5% de una dispersión sólida de nistatina 15 mg/ml y de una suspensión acuosa de nistatina a 15 mg/ml.

En esta gráfica puede apreciarse que la eliminación de la cantidad de nistatina presenta importantes diferencias entre las formulaciones: así, para la suspensión acuosa se elimina el 50% de disolución prácticamente

a los 10 minutos de ensayo, mientras que para la dispersión sólida permanecen casi hasta los 30 minutos. Esta cesión más prolongada de nistatina para la dispersión sólida permitiría un tratamiento más adecuado para los problemas de mucositis orales. De hecho, la representación gráfica de la dispersión sólida presenta una distribución similar a la obtenida por otros autores en la cesión *in vivo* de clorhexidina a partir de capas poliméricas obtenidas por el método de evaporación del disolvente (Juliano, C. et al, 2008). En ambos casos, se aprecia una cesión lineal, con una pendiente similar, a partir de los 40 minutos de ensayo, que puede atribuirse a la completa descomposición y erosión del gel de carboximetilcelulosa y la consiguiente dispersión y liberación de la nistatina sólida.

De forma similar, la figura 53 representa los porcentajes de nistatina adherida a la mucosa oral en ambas formulaciones, con respecto a la nistatina que se obtuvo en el enjuague a tiempo cero. Otros trabajos realizaron estudios similares de velocidades de cesión de fluconazol a partir de dispersiones sólidas formuladas con diferentes polímeros (Yehia, SA. et al, 2008). De hecho, estos autores han correlacionado los efectos de la erosión, el tragado y la cesión propiamente dicha de las formulaciones en ensayos *in vitro* e *in vivo*. La velocidad de liberación de la formulación de maltodextrina podrían relacionarse con la menor cristalinidad de la nistatina observada en los estudios de difracción de rayos X y los estudios de DSC. Posiblemente, la mayor disolución de la forma amorfa de nistatina en la dispersión sólida, disminuye la formación de aglomerados y permite una mayor permanencia del medicamento en la cavidad oral. En la suspensión de nistatina se observa una tendencia lineal dividida en dos partes para la nistatina retenida en la cavidad oral, produciéndose un descenso inicial al principio debido a que, por su gran tamaño de partícula, no se ha integrado en la matriz del gel y se elimina una gran parte hasta los 30 minutos. En el caso de la dispersión sólida, el hecho de presentar menor tamaño de partícula evita que la nistatina se elimine de forma tan rápida y justifica la mayor presencia de nistatina adherida en las paredes de la cavidad oral. La tendencia de ambas formulaciones tiende a adoptar el mismo perfil a partir de los 40 minutos

de ensayo, en los que el gel se ha erosionado por completo y la presencia de moléculas de nistatina adheridas se reduce linealmente en ambos casos, aunque los valores de la dispersión sólida sean significativamente superiores ($p < 0,001$) que los de la suspensión acuosa. La mayor adhesión de nistatina a tiempos inferiores de 30 minutos en el caso de la dispersión sólida parece indicar que las formulaciones de maltodextrinas en enjuagues bucales pueden constituir un tratamiento prometedor en el tratamiento de las mucositis orales que presentan un gran auge en los últimos años. La dispersión sólida presenta mayor cantidad de nistatina adherida a la mucosa bucal en tiempos de ensayo largos, lo que podría ser de utilidad para la prevención de formación de biopelículas orales de *Candida albicans*, sin necesidad de tener que realizar administraciones continuas de la formulación activa.

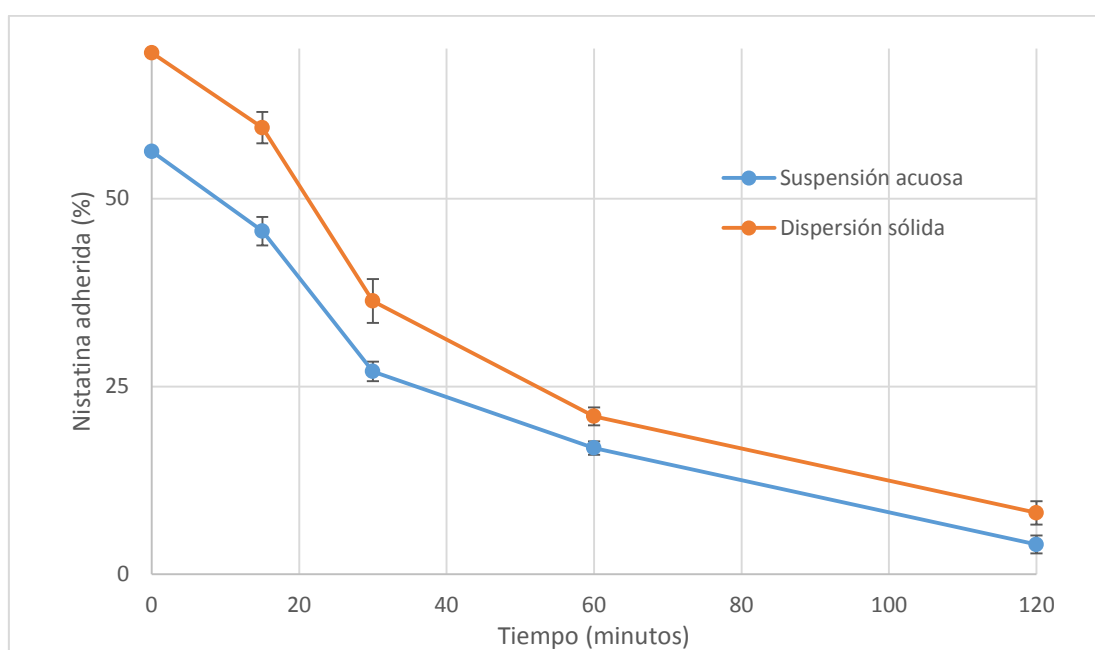


Fig. 53. Porcentaje de nistatina adherida a la mucosa bucal de 8 voluntarios sanos a partir de un gel de 1,5% de CMC de dispersión sólida de nistatina a concentración de 15 mg/ml y de una suspensión acuosa de nistatina a 15 mg/ml.

5.6.3 Correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo*

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* de los geles de carboximetilcelulosa de la dispersión sólida de nistatina revelaron una mayor presencia de moléculas de nistatina adheridas a la superficie de la cavidad bucal para cada tiempo de ensayo, frente a los resultados de la suspensión acuosa. La reducción del tamaño de partícula explicaría un descenso de la tendencia a

formar agregados de moléculas de nistatina de gran tamaño que no son capaces de integrarse íntimamente en la matriz del gel y son eliminados rápidamente por deglución, lo que explica la diferencia de valores *in vivo* de la suspensión acuosa (en la que hay más agregados y, por consiguiente, más cantidad eliminada). Sin embargo, en el ensayo *in vitro* no existe fenómeno de deglución que elimine los agregados de nistatina que no se integren en el gel: esta nistatina, al erosionarse el gel, no es capaz de incorporarse al medio acuoso del vaso del aparato de disolución y permanecería en la celda de cesión, donde cae por un efecto de la gravedad. Esto explica porque los datos *in vitro* presentan mayor cantidad de nistatina retenida en la celda de cesión para la suspensión acuosa que para la dispersión sólida (Tabla 16, capítulo 5.5.4.4).

La tabla 19 recoge los tiempos de eliminación *in vivo* o los periodos de retención en celda de cesión del 20%, 40%, 60% de nistatina incorporada en los geles de suspensión acuosa y de dispersión sólida.

Tabla 19. Tiempo a los que se alcanzan los porcentajes del 25%, 50% y 75% de cantidad de nistatina eliminada *in vivo* y de la cantidad retenida en celda de cesión *in vitro*.

Nistatina (%)	Gel 1,5% CMC Suspensión acuosa		Gel 1,5% CMC Dispersión sólida	
	<i>In vitro</i> (retenida en celda)	<i>In vivo</i> (eliminada)	<i>In vitro</i> (retenida en celda)	<i>In vivo</i> (eliminada)
40	109 ± 0,77 min	< 0 min	60 ± 2,53 min	15 ± 0,63 min
60	53,5 ± 3,66 min	19 ± 0,92 min	38 ± 1,75 min	27 ± 1,07 min
80	32 ± 3,55 min	47 ± 0,51 min	20 ± 2,38 min	64 ± 1,43 min

Los resultados recogidos en la tabla 19 confirman los datos obtenidos en los ensayos tecnológicos, donde se comprobaba la reducción del tamaño de partícula de las moléculas de nistatina de la dispersión sólida. Así, vemos que los tiempos a los que se alcanzan el 40%, 60% y 80% retenidos en la celda de cesión para la dispersión sólida son menores para todos los tiempos estudiados, ya que en esta dispersión sólida la nistatina se retiene en menor proporción, mientras que, para el caso de la suspensión acuosa, se produce la conformación de grandes aglomerados, muy pesados, que se retienen en la celda. De hecho, a los tiempos de ensayo máximo que empleamos (120 minutos) aún estaba retenido por encima del 35 % de la cantidad de nistatina del gel de suspensión acuosa. Sin embargo, en el estudio de los datos *in vivo*, valoramos la cantidad de nistatina eliminada, que no se ha adherido a la superficie de la mucosa bucal o ha sido eliminada por deglución: en estos casos, los tiempos son menores para la

suspensión acuosa, como era de esperar porque el tamaño de partícula les impide fijarse correctamente a las encías y el paladar. De hecho, más del 40% de nistatina de la formulación administrada de la suspensión acuosa no es capaz de adherirse de una forma efectiva al administrarse el gel, con lo que es eliminada antes de comenzar los ensayos. En el caso de la dispersión sólida, el hecho de presentar una mayor integración en el gel y un tamaño de partícula más pequeño, permite que no se alcancen valores de eliminación del 40% hasta los 15 minutos de ensayo, permitiendo actuar de una forma más eficaz a esta formulación. Es importante destacar que, antes de los 50 minutos, se ha eliminado más del 80% de nistatina administrada en la suspensión acuosa, mientras que la eliminación del 80% de nistatina de la dispersión sólida no ocurre hasta los 64 minutos. Este hecho, nos permitiría utilizar el gel de dispersión sólida para tratamientos más prolongados. Aunque los datos sí adoptan la tendencia que se entreveía en el ensayo *in vitro*, es difícil establecer una correlación entre ambos. Ciertos autores han logrado demostrar previamente la correlación existente entre estudios *in vitro* e *in vivo* de nistatina nanotomizada utilizando técnicas de actividad microbiológica (Melkoumov, A. et al, 2013). Dicha correlación también ha sido puesta de manifiesto usando técnicas de determinación *in vitro*, como HPLC y espectrofotometría UV, frente a datos obtenidos *in vivo* (Machado, JC. et al, 2014).

5.7 Discusión parcial:

La elaboración de dispersiones sólidas de nistatina utilizando un transportador hidrofílico de naturaleza polisacáridica, como maltodextrinas, ha demostrado presentar buenas cualidades para ser considerado como alternativa para el tratamiento de mucositis orales por *Candida albicans* y la prevención de la formación de biopelículas de este hongo patógeno. Las maltodextrinas poseen características idóneas para ser excipientes en la formulación de estas dispersiones sólidas, por su fácil manejo, su inocuidad y excelente tolerabilidad, y sus buenas propiedades de solubilidad en agua. Los resultados obtenidos con la dispersión sólida en ensayos fármaco tecnológicos de microscopía electrónica, calorimetría diferencial y rayos X, han puesto de manifiesto la reducción de la cristalinidad y del tamaño de partícula del principio activo, lo que se traduce en

una considerable mejoría de su actividad antifúngica, como se ha demostrado en los ensayos microbiológicos de actividad antibiótica. Además, la capacidad inhibitoria de la formación de biopelículas fúngicas de la dispersión sólida de nistatina también ha sido testada con resultados concluyentes favorables. El empleo de estas dispersiones sólidas en un gel bioadhesivo de carboximetilcelulosa le dota de las características de permanencia en la mucosa de la cavidad bucal, imprescindibles para poder ejercer su acción durante el tiempo necesario para presentar efectividad contra las infecciones por *Candida albicans* de la superficie de la mucosa e inhibir la formación de biopelículas. En este capítulo, se ha ensayado la cesión *in vitro* de un gel de dispersión sólida frente a uno de suspensión acuosa, obteniéndose diferencias claras en cuanto a los perfiles de cesión de ambos, favorables hacia la dispersión sólida. En los ensayos *in vivo* en voluntarios sanos, la dispersión sólida fue mucho mejor tolerada por sus características organolépticas (principalmente, gusto y textura) frente a la suspensión acuosa, lo que disminuirá la cantidad de saborizantes, edulcorantes o etanol que podrían provocar daño y dolor en las lesiones de los pacientes con candidiasis orofaríngea. Además, en este estudio hemos comprobado que la formulación de dispersión sólida alcanza concentraciones en la cavidad bucal por encima de la mínima necesaria para el tratamiento de las biopelículas y mantiene concentraciones superiores a la concentración mínima inhibitoria durante un periodo de tiempo válido para tratamiento de infecciones de *Candida albicans*. No pudo establecerse una correlación clara entre los estudios de cesión *in vitro* y los datos *in vivo* de permanencia en la cavidad bucal debido a factores fisiológicos como la deglución o movimientos mecánicos de la boca. Por ello, deben realizarse futuras investigaciones dónde pueda establecerse dicha correlación, probablemente utilizando técnicas microbiológicas aprovechando las excelentes perspectivas que presentan las dispersiones sólidas de nistatina.

VI. ESTUDIO
COMPARATIVO ENTRE
SISTEMA MICELAR Y
DISPERSIONES SÓLIDAS
DE NISTATINA

VI. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SISTEMA MICELAR Y DISPERSION SÓLIDA DE NISTATINA

Las dos formulaciones de nistatina que demostraron mejores resultados en el aumento de la actividad antifúngica y preventiva de formación de biopelículas fueron el sistema micelar con desoxicolato de sodio en proporción 1:0,8 (SM-N:DC [1:0,8]) y la dispersión sólida con maltodextrinas en proporción 1:6 (DS-N:MD [1:6]). Planteamos en este apartado, una comparación detallada de ambas formulaciones y los resultados obtenidos.

6.1 Aspecto y estabilidad

El análisis de la aparición de precipitados de ambas formulaciones se realizó mediante la fotografía de las formulaciones en gel de carboximetilcelulosa al 1,5%. Se prepararon muestras de suspensión acuosa de nistatina (control), sistema micelar de nistatina y desoxicolato en proporción 1:0,8 y dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6. El procedimiento de preparación de estas formulaciones se describe en el capítulo 5.6.2.

Tras la reconstitución de los sólidos en el gel, se observa en todos los casos la formación de una suspensión homogénea de color anaranjado en el caso de la suspensión acuosa (figura 54a) y de un color amarillo claro para el sistema micelar (figura 54b) y la dispersión sólida (figura 54c). Aunque en los tres casos quedaron restos sólidos en las paredes de los vasos, la dispersión sólida presentó mucha menor cantidad.

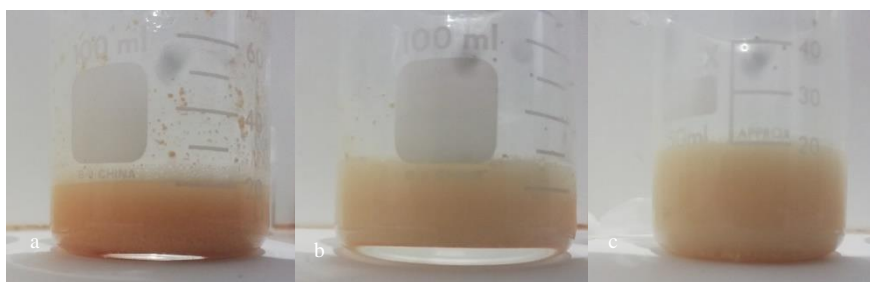


Figura 54. Gel de carboximetilcelulosa al 1,5% formulado con suspensión acuosa de nistatina (a), sistema micelar de nistatina y desoxicolato 1:0,8 y dispersión sólida de nistatina y maltodextrina 1:6. En los tres casos la concentración de nistatina fue de 15mg/ml.

Se comprobó el estado de las suspensiones tras la reconstitución a las 4 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas. A las 4 horas comienza a aparecer un precipitado de nistatina claramente identificable en la suspensión acuosa (figura 55a), mientras que no se evidencia ni en el sistema micelar (figura 55b) ni en la dispersión sólida (figura 55c).

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SISTEMAS MICELARES Y DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

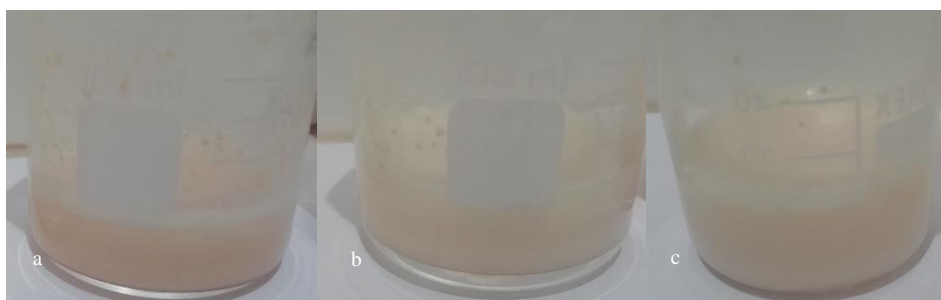


Fig. 55. Gel de carboximetilcelulosa de suspensión acuosa de nistatina (a), sistema micelar de nistatina y desoxicolato 1:0,8 (b) y dispersión sólida de nistatina y maltodextrina 1:6 (c) transcurridas 4 horas tras su formulación.

A las 24 horas de la formulación de los geles, la suspensión acuosa (figura 56a) presenta un precipitado claramente diferenciado en el fondo del vaso de precipitados, correspondiente a nistatina no disuelta. Empieza a aparecer precipitado en el gel de sistema micelar, aunque es poco manifiesto (figura 55b). La dispersión sólida no presenta cambios en cuanto a aparición de precipitado (figura 55c).

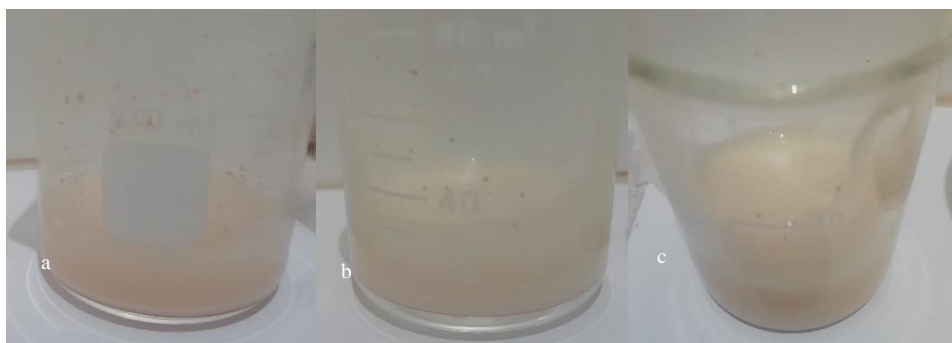


Fig. 55. Gel de carboximetilcelulosa de suspensión acuosa de nistatina (a), sistema micelar de nistatina y desoxicolato 1:0,8 (b) y dispersión sólida de nistatina y maltodextrina 1:6 (c) transcurridas 24 horas tras su formulación.

A las 48 horas, el precipitado de nistatina es totalmente evidente para el caso de la suspensión acuosa (figura 56a). Aunque aún quedan partículas retenidas en el seno del gel de carboximetilcelulosa, comienza a diferenciarse un aclaramiento del gel en la parte superior, consecuencia de la pérdida por gravedad de moléculas en esa zona. En el caso del sistema micelar (figura 56b), no se diferencia claramente precipitado, pero sí comienza a aparecer una zona de aclaramiento en la parte superior del vaso, lo que indica una distribución irregular de las partículas de nistatina. La dispersión sólida (figura 56c) presenta la distribución más homogénea de las tres formulaciones, presentando apenas zona clara y un precipitado imperceptible.

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SISTEMAS MICELARES Y DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

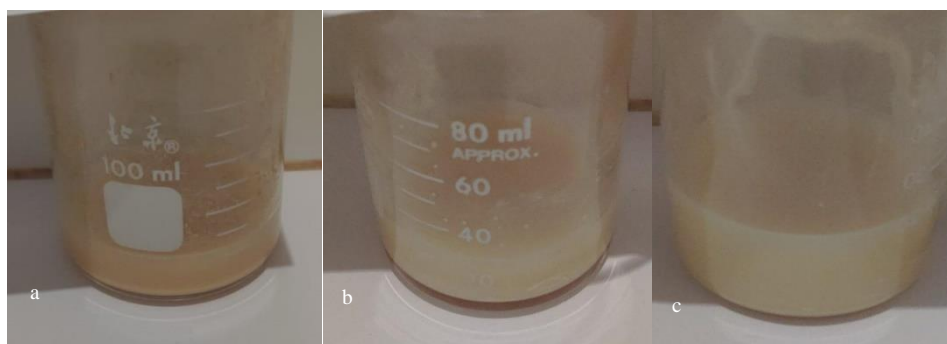


Fig. 56. Gel de carboximetilcelulosa de suspensión acuosa de nistatina (a), sistema micelar de nistatina y desoxicolato 1:0,8 (b) y dispersión sólida de nistatina y maltodextrina 1:6 (c) transcurridas 48 horas tras su formulación.

A las 72 horas, el precipitado es totalmente manifiesto en el gel de suspensión acuosa de nistatina (figura 57a) con una evidente zona transparente donde no quedan moléculas en suspensión. El sistema micelar presenta una zona aclarada superior más marcada y aparece un precipitado considerable en la zona inferior del vaso (figura 57b). La dispersión sólida sigue presentando una conformación homogénea, aunque se evidencia la aparición de precipitado de nistatina en la parte inferior del vaso (figura 57c).

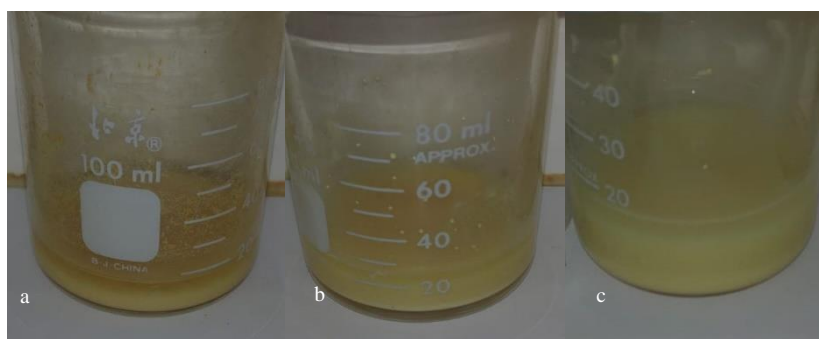


Fig. 57. Gel de carboximetilcelulosa de suspensión acuosa de nistatina (a), sistema micelar de nistatina y desoxicolato 1:0,8 (b) y dispersión sólida de nistatina y maltodextrina 1:6 (c) transcurridas 72 horas tras su formulación.

El último tiempo de estabilidad comprobado fueron 96 horas. La suspensión acuosa (figura 58a) presenta mayor diferencia entre el precipitado y la zona transparente superior, habiendo quedando todo el residuo sólido de nistatina en el fondo del vaso. El sistema micelar presenta una zona transparente muy evidente, pero de menor tamaño que la suspensión acuosa (figura 58b); además, hay una gran cantidad de precipitado en la parte inferior. Por último, la dispersión sólida (figura 58c) comienza a presentar zonas de pérdida de moléculas de nistatina de forma evidente en la parte superior y también presenta

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SISTEMAS MICELARES Y DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

precipitado en el fondo, aunque de menor tamaño que las otras dos formulaciones.

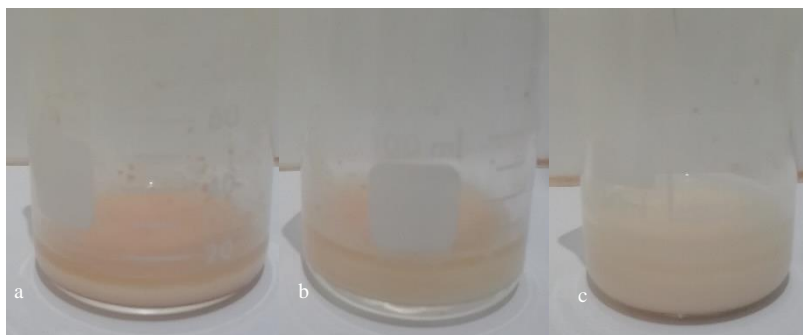


Fig. 58. Gel de carboximetilcelulosa de suspensión acuosa de nistatina (a), sistema micelar de nistatina y desoxicolato 1:0,8 (b) y dispersión sólida de nistatina y maltodextrina 1:6 (c) transcurridas 96 horas tras su formulación.

Según los resultados obtenidos en este estudio de estabilidad, podemos concluir que la formulación más estable es la dispersión sólida, ya que no comienza a presentar un precipitado de nistatina fácilmente evidenciable hasta pasadas 72 horas de su reconstitución, manteniendo la estructura más homogénea de las tres formulaciones ensayadas a lo largo de todo el ensayo. Estos resultados concuerdan con los datos de caracterización farmacotécnica obtenidos (que se comentarán en el capítulo siguiente) y ponen de manifiesto que la matriz de maltodextrinas tiene gran utilidad a la hora de mejorar la estabilidad de nistatina en suspensión.

6.2 Ensayos de caracterización fármaco-tecnológicos

Se realizaron los mismos ensayos de caracterización fármaco-técnica para ambas formulaciones: microscopía electrónica de barrido (SEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de polvo de rayos X (XRPD).

La formulación SM-N:DC [1:0,8] presentaba una estructura propia de suspensiones micelares en la que las moléculas de nistatina se disponen en el interior de dichas estructuras. De hecho, en las imágenes de SEM se aprecia con claridad la disminución del tamaño de partícula de las partículas de nistatina y desoxicolato y el cambio en la morfología, perdiéndose la forma inicial de partículas aciculares y angulosas. Las imágenes obtenidas guardan una perfecta relación con los resultados de los análisis de DSC y XRPD. Además, el cambio

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SISTEMAS MICELARES Y DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

en el aspecto de la nistatina conduce a una reducción notable de la cristalinidad, como se percibe en el patrón obtenido por calorimetría, en la que desaparece el pico de nistatina cristalina, apareciendo uno propio de sistemas micelares que se traduce en un punto de fusión más elevado (ver capítulo 4.4.3). Al igual que los resultados de DSC, el análisis de XRPD concluyó que la inclusión de nistatina en sistemas micelares da lugar a sistemas con una reducción notable de la cristalinidad de las partículas. Por otro lado, el perfil calorimétrico de DS-N:MD (1:6) presenta también una importante reducción de la cristalinidad, correlacionándose con los datos de XRPD en los que se aprecia la aparición de una representación del perfil de la dispersión sólida con una estructura prácticamente amorfa a una intensidad muy baja. Ambos resultados están correlacionados con las imágenes obtenidas por SEM. De hecho, en las microfotografías obtenidas por esta técnica, se observa la formación de una matriz de maltodextrinas, que es capaz de englobar principio activa, reteniéndolo en el interior de las partículas de la matriz. En este caso, no sólo se reduce el tamaño de partícula de los cristales de nistatina presentes en la formulación, sino que, estos cristales, no son detectables en el campo de imagen del microscopio, ya que se encuentran en el interior de la matriz de maltodextrina (ver capítulo 5.3.2). Dicha morfología se correlaciona claramente con los datos de baja cristalinidad y estructura prácticamente amorfa que se obtuvieron con las otras técnicas de caracterización.

6.3 Ensayos microbiológicos

6.3.1 Ensayo *in vitro* de actividad antifúngica

Las diferencias existentes entre la actividad anti *Candida albicans* de ambas formulaciones fueron analizadas al realizar un ensayo de actividad antifúngica de difusión en placa de agar con discos antibióticos con el mismo procedimiento que el realizado en los apartados 4.5.1 y 5.4.1.

Se reconstituyeron las fracciones pulverulentas de las formulaciones en agua bidestilada para obtener en ambos casos suspensiones de nistatina en agua a una concentración de 15 mg/ml. De la misma forma, se preparó una suspensión acuosa de nistatina en agua a idéntica concentración. Se aplicaron las formulaciones sobre los discos de difusión y se cultivaron durante 72 horas, determinándose el tamaño del halo de inhibición por un calibre o pie de rey a las

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SISTEMAS MICELARES Y DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

24 horas y a tiempo final del ensayo. Se dispusieron discos en blanco, que no incorporaban ningún tipo de formulación; y se ensayaron, además, muestras control en las que se añadió, en la misma proporción que en las formulaciones activas, una solución de desoxicolato (Control DC) o de maltodextrinas (control MD). Los resultados obtenidos están recogidos en la tabla 20. Las muestras en blanco no presentaron ningún tipo de inhibición, asegurando la buena realización del ensayo. Las muestras control de desoxicolato y las de maltodextrinas tampoco presentaban halo de inhibición, lo que indica que ninguno de estos excipientes tiene actividad antifúngica. Tanto en la suspensión acuosa como en las dos formulaciones activas, se obtuvo un tamaño de halo que confirma la actividad antifúngica esperada de dichas formulaciones. En el caso de la suspensión de nistatina en agua, el halo fue de $21,02 \pm 1,03$ mm. El sistema micelar presentó un tamaño de halo mayor, de $23,54 \pm 0,73$ mm, indicando así que la actividad antifúngica está aumentada, como era predecible por los datos obtenidos en los ensayos fármacotécnicos en cuanto a reducción de la cristalinidad y del tamaño de partícula. El halo de inhibición obtenido para la dispersión sólida con maltodextrinas en proporción 1:6 fue el halo de mayor tamaño de las tres formulaciones ensayadas ($28,62 \pm 0,32$ mm). Este efecto se explica de igual manera por los resultados obtenidos en los análisis de SEM, DSC y XRPD, en los que se comprobó que la dispersión sólida presentaba una reducción de la cristalinidad de las moléculas de nistatina y un tamaño de partícula menor, lo que le permitiría liberarse y actuar con mayor eficacia frente a las colonias del hongo.

Una gráfica comparativa de los halos de inhibición obtenidos se muestra en la figura 59.

Tabla 20. Ensayo de difusión en disco para actividad antifúngica contra *Candida albicans* CECT 1394

Muestra	Halo de inhibición 24 h (mm)	Halo de inhibición 72 h (mm)
Blanco	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$
Control DC	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$
Control MD	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Suspensión acuosa	$21,03 \pm 1,03$	$19,82 \pm 0,73$
SM-N:DC [1:0.8]	$23,55 \pm 0,78$	$21,51 \pm 0,59$
DS-N:MD (1:6)	$28,62 \pm 0,32$	$27,81 \pm 0,53$

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SISTEMAS MICELARES Y DISPERSIONES SÓLIDAS DE NISTATINA

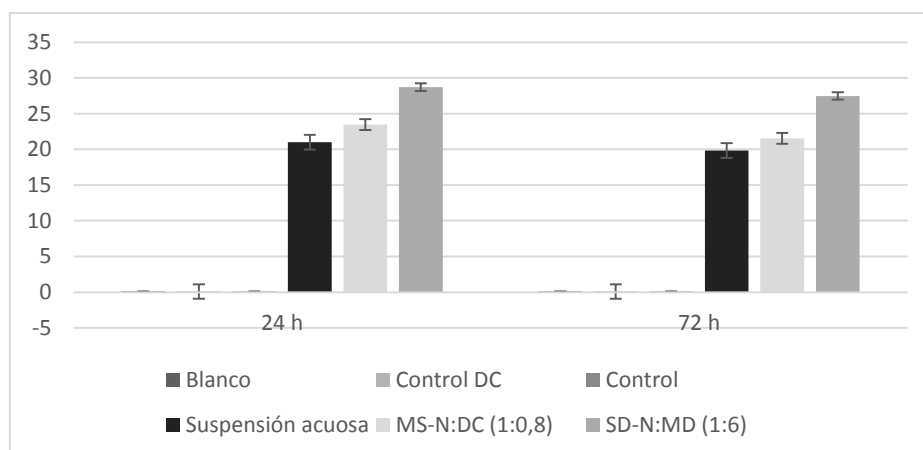


Fig. 59. Comparativa de tamaño de los halos de inhibición obtenidos en el ensayo de actividad antifúngica en placa.

Los datos de actividad microbiológica de los sistemas micelares y las dispersiones sólidas indicaron que éstas últimas presentan mayor actividad frente a *Candida albicans*, ya que a las 24 y a las 72 horas, el tamaño de los halos de inhibición fue significativamente mayor ($p=0000$).

VII.DISCUSIÓN FINAL

VII. DISCUSIÓN FINAL

La búsqueda de la mejora del efecto antifúngico de la nistatina se ha abordado a partir de diferentes estrategias fármaco tecnológicas que sean susceptibles de mejorar las características del principio activo, aumentando la eficacia frente a *Candida albicans* y proporcionando un efecto preventivo de la formación de biopelículas de este microorganismo.

El empleo de tensoactivos para formar una suspensión micelar de mayor estabilidad ha sido previamente utilizado en formulaciones de nistatina (Croy, S. y Kwon, G., 2004). En un inicio, valoramos la formación de una suspensión micelar utilizando dos tipos distintos de tensoactivos: labrasol (no iónico) y desoxicolato de sodio (aniónico) (Kosswig, K., 2005). Mediante un estudio de preformulación, valorando el tamaño de partícula de las moléculas de nistatina y la actividad antifúngica de las formulaciones en ensayos microbiológicos, se concluyó que la suspensión micelar que presentaba una proporción 1:0,8 de nistatina y desoxicolato presentaba mejorías significativas frente a aquellas formulaciones que presentaban labrasol como tensoactivos e incluso, que formulaciones que tenían mezclas de ambos tensoactivos en la misma proporción. Esta formulación presentó el tamaño de partícula más pequeño de las formulaciones ensayadas, evidenciándose, esencialmente, una población mayoritaria (93,6%), de partículas inferiores a 0,2 μm ; mientras que las formulaciones que contenían labrasol o mezclas de labrasol y desoxicolato, presentaron un elevado índice de polidispersabilidad, lo que indica la existencia de dos poblaciones de partículas de distinto tamaño que afectarían a la cesión de nistatina y que, como se ha demostrado, pueden producir toxicidad por acumulación a nivel celular o en ciertos órganos como los riñones (López-Sánchez, A. et al, 2018). A tenor de estos resultados nos decantamos en el estudio de la formulación con desoxicolato de sodio en proporción 1:0,8, que fue caracterizada mediante microscopía electrónica, calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X; en todos estos ensayos, se observó un descenso considerable de la cristalinidad de la nistatina cuando se incluía en el seno del sistema micelar de desoxicolato. Estos descensos en los valores de cristalinidad se correlacionan con valores obtenidos por otros autores en estudios anteriores con otros compuestos de baja solubilidad acuosa (Palmeiro-Roldán, R. et al, 2014). Las imágenes realizadas por microscopía electrónica corroboraron una reducción notable del tamaño de partícula de la nistatina y de su carácter cristalino.

El ensayo microbiológico de difusión de disco en agar demostró una mejoría significativa en la actividad antifúngica de nistatina frente a *Candida albicans* con respecto a los valores de una suspensión acuosa de nistatina a idéntica concentración, aumentando este halo de inhibición desde $20,34 \pm 0,42$ mm para la suspensión de nistatina a las 24h a valores de $22,83 \pm 0,42$ mm para la formulación micelar 1:0.8. Este aumento del efecto antifúngico se correlaciona con los ensayos previamente comentados, ya que, como han demostrado otros autores (Jaiswal, S. et al, 2015) la formación de estructuras micelares minimizan la agregación de las partículas de nistatina, aumentando su difusión al medio y potenciando su eficacia antifúngica. De hecho, el efecto preventivo de la formación de biopelículas también se vio incrementado de manera significativa por la misma razón: se consiguió una reducción de la adherencia de *Candida albicans* sobre un dispositivo de uso clínico en más de un 40%, como consecuencia del aumento de las propiedades hidrofílicas del sistema micelar de nistatina, que potencian la penetración y la adsorción en la superficie del material clínico (Li, J. et al, 2010). Este resultado es especialmente importante en pacientes de larga estancia hospitalaria ya que estas preparaciones micelares 1:0.8 duplican la capacidad de reducción de la adherencia cuando se compara con las formulaciones de suspensión de nistatina a la misma concentración utilizada como formulación de referencia.

La otra estrategia que se planteó como hipótesis para lograr el objetivo del trabajo fue la elaboración de una dispersión sólida de nistatina, ya que dichas formulaciones se usan ampliamente en la actualidad para el desarrollo farmacotécnico de fármacos poco hidrosolubles (Brough, C. y Williams, RO., 2013). Las dispersiones sólidas requieren un agente de carga que debe ser inerte, inocuo, soluble en agua y fácil de utilizar. Previamente, distintos autores han utilizado lactosa como excipiente de dispersión sólida por su sabor agradable (Arch Sakeer, K. et al, 2010). En nuestra formulación, se utilizó maltodextrinas como excipiente, por tener un perfil idóneo para la elaboración de la dispersión sólida de nistatina y porque no presenta posibles intolerancias alimentarias, como sí es el caso de la lactosa. La utilización de maltodextrinas como excipiente en dispersiones sólidas ya ha sido previamente utilizado (Dollo, G. et al, 2003). Para la inclusión de la nistatina en el excipiente se utilizó el método de evaporación del solvente (Saharan, VA. et al, 2009) optimizando sus fases y adecuándolas a nuestra formulación. Se realizaron los mismos ensayos de caracterización farmacotécnica que los utilizados en el estudio de los sistemas micelares

de desoxicolato: microscopía electrónica, calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X. Los datos calorimétricos demostraron la existencia de una interacción entre nistatina y maltodextrina, presente en las mezclas físicas de ambos, debida a la parte de nistatina cristalina incluida en el interior del excipiente. Esta interacción se tradujo en un segundo pico calorimétrico sobre 177,87° C, que ha sido comprobado previamente en ensayos de nistatina (Arch Sakeer, K. et al, 2010). Este descenso en la cristalinidad de la nistatina se confirma en los estudios de difracción de rayos X, observando un descenso de los picos de difracción de la nistatina cuando las proporciones son 1:4 o superiores.

En las dispersiones sólidas es posible apreciar un importante descenso en la cristalinidad del excipiente maltodextrina que se puede atribuir a una reducción global de la cristalinidad producida durante la formación de la dispersión sólida. Especial importancia adquiere el descenso observado en la temperatura de fusión del segundo pico endotérmico atribuido a la nistatina, observando descensos de 177,87° a 175,85°C para la mezcla física y la dispersión sólida 1:6 respectivamente. El descenso en la entalpía de fusión de este segundo pico al aumentar la proporción de maltodextrina indica el carácter mayoritariamente amorfo que adquiere la nistatina en la dispersión sólida. Este resultado se confirma en los estudios de difracción de rayos X donde prácticamente no es posible observar los picos más representativos de la nistatina en las DS-N:MD [1:6] y 1:8 DS-N:MD [1:8]. Esta reducción de cristalinidad ha sido previamente demostrada por autores en el estudio de dispersiones sólidas de sustancias poco solubles en agua mediante el uso del método de evaporación del solvente (Leonardi, D. et al, 2007). De hecho, en las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, se observa la formación de una matriz de maltodextrinas que es capaz de englobar los cristales de nistatina en su interior, explicando así la reducción de la cristalinidad y la adquisición de una estructura prácticamente amorfa.

Los resultados de los ensayos microbiológicos obtenidos con la dispersión sólida DS-N:MD [1:6], fueron significativamente superiores en los ensayos de difusión de disco en agar, obteniéndose tamaños de halo mucho mayores que los obtenidos por una suspensión acuosa de idéntica concentración. Especialmente satisfactorios fueron los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad preventiva de la formación de biopelículas, alcanzándose valores de inhibición de la adhesión de *Candida albicans* sobre un dispositivo clínico por encima del 83%. Esta dispersión sólida se incluyó en un gel de 1,5% de carboximetilcelulosa a

concentración de 15 mg/ml de nistatina para realizar ensayos de evaluación de cesión *in vitro* e *in vivo*, comparándolo con un gel de iguales características de suspensión acuosa de nistatina a la misma concentración como formulación de referencia. Se adaptó el ensayo de cesión *in vitro*, para tratar de simular un enjuague de la cavidad bucal. Este estudio confirmó que la dispersión sólida presentaba un perfil de cesión más favorable, presentando velocidades de cesión más rápidas que las obtenidas en la suspensión acuosa; este hecho se explica por el menor tamaño que presentan las partículas de nistatina de la dispersión sólida, capaces de liberarse al medio al irse erosionando el gel de carboximetilcelulosa a lo largo del tiempo; los grandes agregados de nistatina presentes en la suspensión acuosa, sin embargo, no son capaces de ser arrastrados al medio y quedan retenidos en la celda de cesión utilizada en el ensayo. Estos resultados *in vitro* se compararon frente a una formulación control tipo suspensión y otros estudios *in vitro* de nistatina realizados por otros autores (Park, JB. et al, 2015).

Se realizó una comparación entre las dos formulaciones que respondieron de forma más positiva al objetivo de nuestra hipótesis: sistema micelar de nistatina y desoxicolato en proporción 1:0,8 y dispersión sólida de nistatina y maltodextrinas en proporción 1:6. La evaluación de la estabilidad de las formulaciones mediante estudios del tiempo de sedimentación en una formulación recién reconstituida. Este estudio se realiza de manera visual, valorando el aspecto que presentaban nistatina materia prima, el sistema micelar y la dispersión sólida en suspensión acuosa. Como era de esperar, la suspensión acuosa precipitaba rápidamente, formando grandes agregados que se acumulaban en el fondo del vaso; el sistema micelar presentaba mayor estabilidad, apareciendo los primeros agregados precipitados a partir de las 24 horas; la dispersión sólida presentó la mayor estabilidad de todas, no apareciendo precipitado evidenciable hasta pasados 3 días. Estos valores tan elevados de estabilidad indican una reducción importante del tamaño de partícula de la dispersión sólida, que puede atribuirse al menor tamaño de partícula y mayor dispersabilidad frente a las formulaciones elaboradas a partir de los sistemas micelares. La valoración de los ensayos de difracción de rayos X concluyó que ambas formulaciones produjeron una reducción de la cristalinidad de las partículas de nistatina, adquiriéndose un perfil mayoritariamente amorfo tanto en el sistema micelar como en la dispersión sólida, si bien cuando comparamos ambos procesos, la dispersión sólida presentaba una mayor proporción de nistatina en forma amorfa. Este descenso en la cristalinidad se confirma en los estudios de DSC donde se aprecia que los picos calorimétricos se vieron afectados de forma

diferente en los sistemas micelares frente a la dispersión sólida con maltodextrinas, aunque ambos procesos permitieron reducir el punto de fusión de la nistatina, como consecuencia de la reducción de la cristalinidad. En cuanto al ensayo de actividad antifúngica, los tamaños de halo fueron significativamente superiores para el caso de la dispersión sólida con respecto al sistema micelar y a la suspensión acuosa empleada como control. La mejoría de la actividad antifúngica justificó la elección de la dispersión sólida para realizar los ensayos de cesión *in vitro* e *in vivo*, a lo que se añade la posible toxicidad por vía oral del desoxicolato de sodio del sistema micelar (Latta, RK. et al, 1993), que puede dañar la mucosa oral de los voluntarios, motivo por el que desecháramos los enjuagues *in vivo* con esta formulación.

Se realizó un ensayo *in vivo*, en 8 voluntarios sanos, para comprobar la permanencia de nistatina a lo largo del tiempo en la cavidad bucal. Se evaluaron, de igual forma que en el ensayo *in vitro* dos formulaciones con el gel de carboximetilcelulosa de dispersión sólida de nistatina: maltodextrina en proporción 1:6 y una suspensión acuosa, ambas a concentración de 15 mg/ml. Todos los voluntarios coincidieron en que la toma del gel de suspensión acuosa fue considerablemente más desagradable que la dispersión sólida. Se comprobó el perfil de retención de nistatina en la cavidad bucal, que se encuentra adherida a las paredes de la mucosa, fue más favorable para la dispersión sólida que para la suspensión acuosa. Esta diferencia se debe, nuevamente al tamaño de partícula de nistatina en ambas formulaciones: la dispersión sólida, al presentar un tamaño de partícula más pequeño de maltodextrina incluyendo en su interior la nistatina, es capaz de integrarse más íntimamente en la matriz de carboximetilcelulosa, retrasándose su eliminación por los movimientos mecánicos de la boca. Por otra parte, la suspensión acuosa, al presentar aglomerados de nistatina de mayor tamaño de partícula se elimina con mayor rapidez, reduciéndose la cantidad que hay en la boca. Este mayor tamaño impide que se adhiera con la misma eficacia que la dispersión sólida, eliminándose una gran parte de la nistatina al desechar la formulación en el enjuague, tras 2 minutos de contacto. El estudio de las concentraciones presentes en la cavidad bucal por cm² de superficie mucosa permite concluir que la dispersión sólida si es capaz de tratar biopelículas, alcanzándose valores por encima de 16 µg/ml, necesarios para la eliminación de estas biopelículas (Paula, SB. et al, 2015). La suspensión acuosa, sin embargo, no es capaz de alcanzar dichas concentraciones, presentando únicamente valores adecuados para un efecto fungicida frente a *Candida albicans*, por encima de 4

µg/ml. Los valores de concentración obtenidos fueron, en todos los casos, más elevados en la dispersión sólida que en la suspensión acuosa. Aunque los resultados son considerablemente mejores para la dispersión sólida que para la suspensión acuosa tanto en el ensayo *in vitro* como en el *in vivo*, no fue posible realizar una correlación adecuada entre ambos.

Con los datos obtenidos en este trabajo, podemos determinar que la dispersión sólida de nistatina y maltodextrina en proporción 1:6 presenta el perfil más adecuado para ser utilizado para el tratamiento de mucositis orales de *Candida albicans* y la prevención de formación de biopelículas en dispositivos de uso clínico. Sus excelentes características fármaco-tecnológicas, demostradas con ensayos de caracterización, con una importante reducción de la cristalinidad del principio activo y la adquisición de una estructura mayoritariamente amorfa, unido a su escasa toxicidad, su fácil manejo y sus propiedades de hidrosolubilidad permiten su inclusión de una forma altamente eficaz en geles de polímeros de celulosa, favoreciendo su permanencia en la cavidad oral, pudiendo ejercer su efecto antifúngico de forma más favorable. Además, la buena tolerabilidad por parte de los voluntarios en el ensayo *in vivo*, lo hacen adecuado para garantizar el cumplimiento del tratamiento. En nuestro caso, no fue posible realizar una correlación efectiva entre los datos *in vitro* y los obtenidos *in vivo*; sin embargo, creemos que es en un futuro sería posible intentar obtener correlaciones mediante técnicas microbiológicas, como han demostrado otros autores (Melkoumov, A. et al, 2013). Por ello, pensamos que es importante realizar futuros ensayos e investigaciones para comprobar la existencia de dicha correlación y dotar a esta dispersión sólida de una robustez adecuada para considerarla como alternativa al tratamiento de las mucositis orales, tan frecuentes actualmente en nuestros medios hospitalarios. Una estrategia prometedora para futuros estudios puede ser la combinación de formulaciones de nistatina con mejoras en estabilidad, como las que hemos presentado, junto con cepas probióticas y complementos prebióticos capaces de repoblar la microbiota de la cavidad oral, impidiendo la colonización por hongos patógenos.

VIII.CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

- 1- Nistatina es un principio activo antifúngico infrautilizado debido a los problemas farmacotécnicos que presenta, especialmente su baja solubilidad acuosa y su tendencia a la agregación en suspensión, lo que hace que haya muy pocas formulaciones comercializadas con este principio activo para el tratamiento de mucositis orales.
- 2- De los tensoactivos estudiados, el desoxicolato sódico permite obtener sistemas micelares de desoxicolato:nistatina (1:0,8) muy homogéneos con un tamaño medio de partícula pequeño, presentando más del 90% de las partículas tamaños inferiores a 200 nm, con muy baja tendencia a la aglomeración, y menos del 0,3% de partículas con tamaños superiores a 2 μm .
- 3- En cuanto a la actividad antifúngica, los sistemas micelares de desoxicolato:nistatina [1:0,8] destacan especialmente por su efecto sobre la actividad preventiva de la formación de biopelículas consiguiendo reducciones de la adhesión de *Candida albicans* (CECT 1394) en más de un 40% en los dispositivos clínicos, valores que duplican los obtenidos con la formulación de referencia de nistatina.
- 4- La formulación de una dispersión sólida de nistatina mediante el método de evaporación del solvente, utilizando maltodextrinas como excipiente inerte en proporción 1:6, permite obtener formulaciones de nistatina prácticamente amorfa y con un tamaño de partícula más reducido que permite aumentar los tiempos de sedimentación de esta formulación una vez reconstituida.
- 5- La forma farmacéutica de gel de carboximetilcelulosa al 1,5% conteniendo esta dispersión sólida de maltodextrina:nistatina [1:6], mejora la palatabilidad de la formulación y potencia sus propiedades de adhesividad. Los estudios de cesión *in vitro* han demostrado una liberación de la nistatina en estos sistemas presenta una cesión rápida y evita la formación de agregados de nistatina observados en la formulación de referencia.
- 6- Los estudios microbiológicos demuestran que estas propiedades farmacotécnicas dotan a las dispersiones sólidas de maltodextrina:nistatina [1:6] de un perfil óptimo de actividad antifúngica, destacando especialmente por

presentar una actividad preventiva en la formación de biopelículas que alcanza valores superiores al 83% de inhibición de la adhesión de *Candida albicans* (CECT 1394) sobre los dispositivos clínicos.

7- El gel de dispersión sólida 1:6 presenta un perfil de cesión más adecuado en la cavidad bucal, siendo la única formulación capaz de alcanzar concentraciones *in situ* superiores a 16 µg/ml, necesarios para inhibir la formación de biopelículas a la vez que presenta concentraciones fungicidas durante tiempos cercanos a 60 minutos tras su administración.

8- Se necesita un desarrollo más prolongado y nuevas investigaciones y ensayos para poder establecer una correlación entre los datos *in vitro* e *in vivo* de la cesión del gel de dispersión sólida de nistatina, que, probablemente, necesita incluir datos microbiológicos.

9- Futuros estudios deberían valorar la combinación de mejoras en la estabilidad farmacotécnica de formulaciones de nistatina junto con la administración probióticos y prebióticos con el fin de buscar un efecto sinérgico ante la colonización por *Candida albicans* de la cavidad oral.

IX.BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Abu Hashim, II., Ghazy, NF., El-Shabouri, MH. (2015) Potential use of phospholipids in combination with hydrophilic carriers for enhancement of the dissolution and oral bioavailability of imidazole antifungal Class II drugs. *Pharmazie*; 70(11):706-15.
- 2- Acofarma, Ficha técnica carboximetilcelulosa [//www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4202-d2fa20f6ffb1f7c5e800e786e4720c4ce163fe5f/main/files/Carboximetilcelulosasodica.pdf](http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4202-d2fa20f6ffb1f7c5e800e786e4720c4ce163fe5f/main/files/Carboximetilcelulosasodica.pdf).
- 3- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (2015) *Real Farmacopea Española*, 5.^a ed.
- 4- Al-Alaiyan, S. (2012) Chemoprophylaxis of neonatal fungal infections in very low birth weight infants: efficacy and safety of fluconazole and nystatin. *J Clin Neonatal*; 1 (4): 178-9.
- 5- Ansari, MA., Khan, HM., Khan, AA., Cameotra, SS., Saquib, Q., Musarrat, J. (2014) Gum arabic capped-silver nanoparticles inhibit biofilm formation by multi-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Basic Microbiol*; 54(7):688-99.
- 6- Arch Sakeer, K., Al-Zein, H., Hassan, I., Desai, S., Nokhodchi, A. (2010) Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and solid dispersion formulation. *Pharm Res*; 33(11):1771-9.
- 7- Arendrup, MC., Patterson, TF. (2017) Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis*; 216.
- 8- Bachmann, SP., Van der Walle, K., Ramage, G., Patterson, TF., Wickes, BL., Graybill, JR., López-Ribot, JL. (2002) *In vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 3591-3596.
- 9- Basta, AH., El-Saied, H., El-Deftar, MM., El-Henawy, AA., El-Sheikh, HH., Abdel-Shakour, EH., Hasanin, MS. (2016) Properties of modified carboxymethyl cellulose and its use as bioactive compound. *Carbohydr Polym*; 153:641-651.

- 10- Benavent, C., García-Herrero, V., Torrado, C., Torrado-Santiago, S. (2019) Nystatin antifungal micellar systems on endotracheal tubes: development, characterization and *in vitro* evaluation. *Pharmazie*; 74.
- 11- Boucherit-Atmani, Z., Seddiki, SML., Boucherit, K., Sari-Belkharoubi, L., Kunkel, D. (2011) *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B, *Journal de Mycologie Medicale*; 21, 182—187.
- 12- Brough, C., Williams, RO. (2013) Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. *Int J Pharm*; 453:157–66.
- 13- Brown, GD., Drummond, RA., Gaffen, SL., Hise, AG. (2015). Innate Defense against Fungal Pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 5(6).
- 14- Cal, K., Sollohub, K. (2010) Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *J Pharm Sci*; 99(2):575-86.
- 15- Cataldi, V., Di Campi, E., Fazii, P., Traini, T., Cellini, L., Di Giulio, M. (2016) *Candida* species isolated from different body sites and their antifungal susceptibility pattern: Cross-analysis of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms; *Med Mycol*; 55(6):624-634.
- 16- Cavallari, C., Brigidi, P., Fini, A. (2015) *Ex-vivo* and *in-vitro* assessment of mucoadhesive patches containing the gel-forming polysaccharide psyllium for buccal delivery of chlorhexidine base. *Int J Pharm*; 496(2):593-600.
- 17- Ceccarelli, G., Giuliano, S., Falcone, M., Venditti, M. (2013) Topical nystatin prophylaxis: a likely viable measure for reducing impact of candidemia in neurosurgical patients with early tracheostomy intubation. *Crit Care*; 17(1):414.
- 18- Cerdeira, AM., Mazzotti, M., Gander, B. (2013) Formulation and drying of miconazole and itraconazole nanosuspensions. *International Journal of Pharmaceutics*; 443, 1–2, 25:209-220.
- 19- Chandra, J., Kuhn, DM., Mukherjee, PK., Hoyer, LI., McCormick, T., Ghannoum, MA. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida*

albicans: development, architecture and drugresistence. Journal of Bacteriology; 5385-5394.

20- Chemical Heritage Foundation (2016). Rachel Brown and Elizabeth Hazen, Archive and history.

21- Chiou, WL., Riegelman, S. (1971) Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. J Pharm Sci; 60:1281–302.

22- Chow Chan, C., Rebelo-Cameirao, A., Lee, YC. (2004) Dissolution method validation. In: Chow Chan, C., Lam, H., Lee, YC., Ming Zhang, X. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. USA; p. 51- 66.

23- Collett, JH., Flood, BL., Sale, FR. (1976) Some factors influencing dissolution from salicylic acid-urea solid dispersions. J Pharm Pharmacol; 28(4):305-8.

24- Colombo, AL., Júnior, JNA., Guinea, J. (2017). Emerging multidrug-resistant *Candida* species. Curr Opin Infect Dis; 30(6):528-538.).

25- Coronado-Castellote, L., Jimenez-Soriano, Y. (2013) Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. J Clin Exp Dent; 5(5): e279–e286.

26- Crespo Erchiga, V. y Delgado Florencio, V. (2005) Micosis Cutáneas. Medicina Clínica; 125 (12): 467-474.

27- Croy, S., Kwon, G. (2204) *The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin*, Journal of Controlled Release; 95: 161– 171.

28- Cruciani, M., de Lalla, F., Mengoli, C. (2005) Prophylaxis of *Candida* infections in adult trauma and surgical intensive care patients: a systematic review and meta-analysis, Intensive Care Med; 31:1479–1487.

29- da Silva Dantas, A., Lee, KK., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., Gow, NA. (2016). Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. Curr Opin Microbiol.; 34:111-118.

30- Dannenfelser, RM., He, H., Joshi, Y., Bateman, S., Serajuddin, AT. (2004) Development of clinical dosage forms for a poorly water soluble drug I:

Application of polyethylene glycol-polysorbate 80 solid dispersion carrier system. J Pharm Sci.; 93(5):1165-75.

31- de Aguiar, MM., de Albuquerque, RP., Marinho, DS., Braga, BR., Dornelas, CB., Oliveira, A., de Sousa, VP., Torres, SR., Alviano, DS., Alviano, CS., Cabral, LM., Holandino, C. (2010) Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. Drug Dev Ind Pharm; 36(5):594-600.

32- Díaz Caballero, AJ., Vivas Reyes, R., Puerta, L., Ahumado Monterrosa, M., Arévalo Tovar, L., Cabrales Salgado, R., Herrera Herrera, A. (2011) Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: una revisión Avances en Periodoncia; vol.23 nº 3.

33- Ding, X., Suzuki, S., Shiga, M., Ohbayashi, N., Kurabayashi, T., Moriyama, K. (2018) Evaluation of tongue volume and oral cavity capacity using cone-beam computed tomography. Odontology; 106(3):266-273.

34- Djordjevic, L., Primorac, M., Stupar, M., Krajisnik, D. (2004) Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. Int J Pharm; 271(1-2):11-9.

35- Dollo, G., Le Corre, P., Guérin, A., Chevanne, F., Burgot, JL., Leverge, R. (2003) Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. Eur J Pharm Sci; 19(4): 273–280.

36- Dorocka-Bobkowska, B., Konopka, K., Düzgüneş, N. (2003) Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells *in vitro*. Arch Oral Biol; 48(12):805-14.

37- Douglas, LJ. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol; 11:30–6.

38- Durham, PG., Young, EF., Braunstein, MS., Welch, JT., Hickey, AJ. (2016) A dry powder combination of pyrazinoic acid and its n-propyl ester for aerosol administration to animals. Int J Pharm; 514(2):384-391.

- 39- Eber, MR., Laxminarayan, R., Perencevich, EN., Malani, A. (2010) Clinical and economic outcomes attributable to health care-associated sepsis and pneumonia. *Archives of Internal Medicine*; 170(4), 347-353.
- 40- Edward, KH., Li, D. (2008) *Drug Like Properties: Concept, Structure, Design and Methods, from ADME to Toxicity Optimization*. Solubility; p. 56.
- 41- Einarsson, K., Hellström, K. (1974) The formation of deoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in man, *Clin Sci Mol Med*; 46(2):183-90.
- 42- El-Shabouri, MH. (2002) Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *Int J Pharm*; 249(1-2):101-8.
- 43- Enoch, DA., Yang, H., Aliyu, SH., Micallef, C. (2017) The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods Mol Biol.*; 1508:17-65.
- 44- Epstein, JB. (1998) Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies., *Polsky B Clin Ther*; 20(1): 40-57.
- 45- Estivill, D., Arias, A., Torres-Lana, A., Carrillo-Muñoz, AJ., Arévalo, MP. (2011) Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods*; 86(2):238-42.
- 46- European Chemicals Agency. (2019) echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/18575.
- 47- European Medicine Agency (2018) Committee for Human Medicinal Products: ICH guideline Q3C (R7) EMA/CHMP/ICH/82260/2006 on impurities: guideline for residual solvents; Appendix 1, p. 15.
- 48- Federal Drug Administration. (1998) Appendix 5, Toxicological data for class 2 solvents; draft 7, p. 26.
- 49- Ferenz, RL., Kennedy, GL. (1986) Reproduction study of dimethylacetamide following inhalation in the rat. *Fund. Appl. Toxicol*; 7: 132-7.
- 50- Fernández Alonso, R., González García, M E., Fernández García, J., Cepeda Piorno, F J. (2005) Fármacos antifúngicos. Situación actual y pautas para su administración. *Clin. Transl. Oncol*; 7(9): 377-388.

- 51- Ferner, R. (1996). Martindale's Extra Pharmacopoeia, 28^a ed. The Pharmaceutical Press, London, UK; 799.
- 52- Finkel, JS., Mitchell, AP. (2011) Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol; 9(2):109-18.
- 53- Florence, AT. (1981) Techniques of solubilization of drugs. In: Yalkowsky, SH., editor. Marcel Dekker, Inc; New York.
- 54- Fonseca-Berzal, C., Palmeiro-Roldán, R., Escario, JA., Torrado, S., Arán, VJ., Torrado-Santiago, S., Gómez-Barrio, A. (2015) Novel solid dispersions of benznidazole: preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. Exp Parasitol; 149:84-91.
- 55- Gangadhar, KN., Adhikari, K., Srichana, T. (2014) Synthesis and evaluation of sodium deoxycholate sulfate as a lipid drug carrier to enhance the solubility, stability and safety of an amphotericin B inhalation formulation. Int J Pharm; 471(1-2):430-8.
- 56- García-Herrero, V., Torrado, C., García-Rodríguez, JJ., López-Sánchez, A., Torrado, S., Torrado-Santiago, S. (2017) Improvement of the surface hydrophilic properties of naproxen particles with addition of hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulphate: In vitro and in vivo studies. Int J Pharm; 529(1-2):381-390.
- 57- García-Martos, P., Domínguez, I., Maín, P., García-Agudo, R., Aoufi, S., Mira, J. (2001). Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.; 19:249-256.
- 58- Gattefosse. (2018) Ficha técnica de labrasol; www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/labrasol.
- 59- Ghosh, PK., Umrethia, ML., Majithiya, RJ., Murthy, RSR. (2004) Preparation and Physicochemical characterisation of caprylocapryl macrogol -8-glycerides microemulsion for oral drug delivery; Ars Pharm; 45 (3): 353-372.
- 60- Ghule, P. (2018) Amorphous solid dispersion: a promising technique for improving oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. South African Pharmaceutical Journal; 85: 50-56.

- 61- Girotra, P., Thakur, A., Kumar, A., Singh, SK. (2017) Identification of multi-targeted anti-migraine potential of nystatin and development of its brain targeted chitosan nanoformulation. *Int J Biol Macromol*; 96:687-696.
- 62- Gizdavic-Nikolaidis. M., Bennett, J., Swift, S., Easteal, A., Ambrose, M. (2011) Broad spectrum antimicrobial activity of functionalized polyanilines, *Acta Biomaterialia*; 7 (12):4204-9.
- 63- Greenhalgh, DJ., Williams, AC., Timmins, P., York, P. (1999) Solubility parameters as predictors of miscibility in solid dispersions. *J Pharm Sci*; 88 (11):1182-90.
- 64- Gurguí, M., Cuenca-Estrella, M., (2008). Situación actual de las infecciones fúngicas invasivas. Las nuevas técnicas diagnósticas y los nuevos antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; Vol. 26 Supl 14:1-6.
- 65- H Grain Processing Corporation. (2008) Technical literature: Maltrin maltodextrins and corn syrup solids.
- 66- Habib, MJ. (2000), *Pharmaceutical Solid Dispersion Technology*; Technomic publishing Company; p. 16.
- 67- Hassan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N., Fries, B. (2009) Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection*; 11: 753-761.
- 68- Hazen, EL., Brown, R. (1951) Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. (18297). *Proc Soc.Exp Biol Med*; 76:93-97.
- 69- Hemmateenejad, B., Nekoeinia, M., Absalan, G., Ansari, M. (2014) Photodegradation study of nystatin by UV-Vis spectrophotometry and chemometrics modeling. *J AOAC Int*; 97(4):1206-12.
- 70- Hoffman, NE., Iser, JH., Smallwood, RA. (1975) Hepatic bile acid transport: effect of conjugation and position of hydroxyl groups; *Am J Physiol*; 229(2):298-302.
- 71- Horvath, R., Collignon, P. (2003) Controlling intravascular catheter infections. *Aust Prescr*; 26:41-3.

- 72- Hotta, J., Cral, WG., Sakima, VT., Lara, VS., Urban, VM., Neppelenbroek, KH. (2017) Intraoral Device for Optimal Antifungal Delivery in a Rat Model. *Curr Drug Deliv*; 14(5):658-667.
- 73- Huang, Y., Dai, WG. (2014) Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*; vol 4 (1):18-
- 74- Hussein-Al-Ali, SH., El Zowalaty, ME., Kura, AU., Geilich, B. (2014) Antimicrobial and controlled release studies of a novel nystatin conjugated iron oxide nanocomposite. *Biomed Res Int*; 651831.
- 75- Hwang, SR., Kim, IJ., Park, JW. (2015) Formulations of deoxycholic for therapy: a patent review (2011 - 2014); *Expert Opin Ther Pat*; 25(12):1423-40.
- 76- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). (2019) Notas Técnicas de Prevención: NTP: 376, 473, 539, 625, 689, 700, 802, 822.
- 77- Jabra-Rizk, MA., Falker, WA., Meiller, T. (2004) Fungal biofilms and drug resistance. *Emerging Infectious Diseases*; vol. 10 (1): 14-19.
- 78- Jaiswal, S., Bhattacharya, K., McHale, P., Duffy, B. (2015) Dual effects of β -cyclodextrin-stabilised silver nanoparticles: enhanced biofilm inhibition and reduced cytotoxicity. *J Mater Sci Mater Med*; 26(1):5367.
- 79- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, MA., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, MA. (2018) Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*; 81(1):7-11.
- 80- Janakiraman, V., Englert, D., Jayaraman, A., Baskaran, H. (2009) Modeling growth and quorum sensing in biofilms grown in microfluidic chambers. *Ann Biomed Eng*; 37(6):1206-16.
- 81- Janssens, S., Van den Mooter, G. (2009) Review: physical chemistry of solid dispersions. *J Pharm Pharmacol*; 61(12):1571-86.
- 82- Jasso Gutiérrez, L. (2011) Infecciones congénitas poco habituales de transmisión vertical. *Bol Med Hosp Infant México*; 68(1):7-20.
- 83- Jeon, HJ., Jeong, Y., Jang, MK., Park, YH., Nah, JW. (2000) Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly (DL-lactide-co-glycolide)

- 93- Kosswig, K. (2005) Surfactants. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim.
- 94- Kuhn, DM., George, T., Chandra, J., Mukherjee, PK., Ghannoum, MA. (2002) Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*; 46(6):1773-80.
- 95- Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, NZ., Hasnain, SE. (2017) Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol*; 307(8):481-489.
- 96- Labreche, D. (2010) *Syringe* solutions for generic drugs. *Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer*; 48: 30-34.
- 97- Lan, Y., Xu, M., Ohm, JB., Chen, B., Rao, J. (2019) Solid dispersion-based spray-drying improves solubility and mitigates beany flavour of pea protein isolate. *Food Chem*; 278:665-673.
- 98- Larsen, SW., Ankersen, M., Larsen, C. (2004) Kinetics of degradation and oil solubility of ester prodrugs of a model dipeptide (Gly-Phe). *Eur J Pharm Sci*; 22: 399–408.
- 99- Latta, RK., Fiander, H., Ross, NW., Simpson, C., Schneider, H. (1993) Toxicity of bile acids to colon cancer cell lines.; *Cancer Lett*; 70(3):167-73.
- 100- Leite de Andrade, MC., Soares de Oliveira, MA., Santos, FAGD., Ximenes Vilela, PB., da Silva, MN., Macêdo, DPC., de Lima Neto, RG., Neves, HJP., Brandão, ISL., Chaves, GM., de Araujo, RE., Neves, RP. (2017) A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. *PLoS One*: 12(11): e0188020.
- 101- Leonardi, D., Barrera, MG., Lamas, MC., Salomon, CJ. (2007) Development of prednisone: polyethylene glycol 6000 fast-release tablets from solid dispersions: solid-state characterization, dissolution behavior, and formulation parameters. *AAPS PharmSciTech*; 8(4):E108.
- 102- Leonardi, D., Salomon, CJ. (2013) Unexpected performance of physical mixtures over solid dispersions on the dissolution behavior of benznidazole from tablets. *J Pharm Sci*; 102(3):1016-23.

- 103- Lescano, GM., Pettigrosso, RS., Llabot, JM. (2014) Study of the physical-chemical properties of commercial Nystatin using solid state characterization techniques. *Rev. mex. cienc. Farm*; vol.45, nº. 2.
- 104- Li, J., Barrow, D., Howell, H., Kalachandra, S. (2010) *In vitro* drug release study of methacrylate polymer blend system: effect of polymer blend composition, drug loading and solubilizing surfactants on drug release. *J Mater Sci Mater Med*; 21(2):583-8.
- 105- Llabot, JM., Manzo, RH., Allemandi, DA. (2009) Novel mucoadhesive extended release tablets for treatment of oral candidosis: "*in vivo*" evaluation of the biopharmaceutical performance. *J Pharm Sci*; 98(5):1871-6.
- 106- Llabot, JM., Palma, SD., Manzo, RH., Allemandi, DA. (2007) Design of novel antifungal mucoadhesive films Part I. Pre-formulation studies. *Int J Pharm*; 330(1-2):54-60.
- 107- López-Sánchez, A., Pérez-Cantero, A., Torrado-Salmerón, C., Martín-Vicente, A., García-Herrero, V., González-Nicolás, MÁ., Lázaro, A., Tejedor, A., Torrado-Santiago, S., García-Rodríguez, JJ., Capilla, J., Torrado, S. (2018) Efficacy, biodistribution, and nephrotoxicity of experimental Amphotericin B-Deoxycholate formulations for pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*; 62(7).
- 108- Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, JC., Lizasoain, I., Moro, MA., Portolés, A. (2012) Velázquez, Manual de Farmacología básica y clínica. Editorial Panamericana; Madrid.
- 109- Lyu, X., Zhao, C., Yan, ZM., Hua, H. (2016) Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*; 10: 1161–1171.
- 110- Madgulkar, A., Bandivadekar, M., Shid, T., Rao, S. (2016) Sugars as solid dispersion carrier to improve solubility and dissolution of the BCS class II drug: clotrimazole. *Drug Dev Ind Pharm*; 42(1):28-38.
- 111- Machado, JC., Lange, AD., Todeschini, V., Volpato, NM. (2014) Development and validation of a discriminative dissolution method for

atorvastatin calcium tablets using *in vivo* data by LC and UV methods. AAPS PharmSciTech; vol. 15, nº. 1.

112- Maestre Vera, JR., Alou Cervera, L. (2001) Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. Revista Española de Quimioterapia; vol. 14, nº 3.

113- Maki, DG., Weise, CE., Sarafin, HW. (1977) A semiquantitative culture method for identifying intravenous catheter related infection. N Engl J Med; 296:1305–9.

114- Malley, LA., Slone, TW., Makovec, GT., Elliott, GS., Kennedy, GL. (1995) Chronic toxicity/oncogenicity of dimethylacetamide in rats and mice following inhalation exposure. Fundam Appl Toxicol; 28(1):80-93.

115- Manzano, P., Méndez, L., Hernández, F., López, R. (2008) La resistencia a los antifúngicos: Un problema emergente en México. Gaceta Médica Mexicana; vol. 144, Nº1: 23-26.

116- Marcos-Zambrano, LJ., Puig-Asensio, M., Pérez-García, F., Escribano, P., Sánchez-Carrillo, C., Zaragoza, O., Padilla, B., Cuenca-Estrella, M., Almirante, B., Martín-Gómez, MT., Muñoz, P., Bouza, E., (2017). *Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia. J. Antimicrob Agents Chemother; 61(7).

117- Marín Martínez, EM., Aller García, AI., Martín-Mazuelos, E. (2016) Epidemiology, risk factors and in vitro susceptibility in candidaemia due to non-*Candida albicans* species. Rev Iberoam Micol; 33(4):248-252.

118- Martin, A. (1993) Physical Pharmacy. 4th edition. Williams and Wilkins. Baltimore, Md, USA.

119- Martins, HP., da Silva, MC., Paiva, LC., Svidzinski, TI., Consolaro, ME. (2012) Efficacy of fluconazole and nystatin in the treatment of vaginal *Candida* species. Acta Derm Venereol; 92(1):78-82.

120- Martins, N., Ferreira, IC., Barros, L., Silva, S., Henriques, M. (2014) Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. Mycopathologia; 177 (5–6): 223–40.

- 121- McEvoy, GK. (2006) American hospital formulary service. AHFS drug information. American society of health-system pharmacists, Bethesda, MD; 543.
- 122- McGee, DC., Gould, MK. (2003) Preventing complications of central venous catheterization. N Engl J Med; 348:1123–33.
- 123- McGregor, DB. (1988) NIOSH report;. Government Report Announcements n°. 27 PB83 - 7 14973 - 2.
- 124- Melkoumov, A., Goupil, M., Louhichi, F., Raymond, M., de Repentigny, L., Leclair, G. (2013) Nystatin nanosizing enhances *in vitro* and *in vivo* antifungal activity against *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother; 68(9):2099-105.
- 125- Merseguel, KB., Nishikaku, AS., Rodrigues, AM., Padovan, AC., RCEF., Salles de Azevedo Melo, A., da Silva Briones, MR., Colombo, AL. (2015) Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. BMC Infect Dis; 15:57.
- 126- Ministerio de Ciencia e Innovación. Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. (2017) Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2016.
- 127- Mobasheri, M., Attar, H., Rezayat Sorkhabadi, SM., Khamesipour, A., Jaafari, MR. (2015) Solubilization behavior of polyene antibiotics in nanomicellar system: insights from molecular dynamics simulation of the Amphotericin B and Nystatin interactions with polysorbate 80. Molecules; 21 (1):E6.
- 128- Moreno-Rodríguez, AC., Torrado-Durán, S., Molero, G., García-Rodríguez, JJ., Torrado-Santiago, S. (2015) Efficacy and toxicity evaluation of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. Int J Pharm; 494(1):17-22.
- 129- Mu, M., Konno, T., Inoue, Y., Ishihara, K. (2017) Solubilization of poorly water-soluble compounds using amphiphilic phospholipid polymers with different molecular architectures. Colloids Surf B Biointerfaces; 158:249-256.

- 130- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2006) *Microbiología Médica*. 5ta. Edición. Elsevier España; 707-800.
- 131- Mycostatin, ficha técnica, Agencia Española del Medicamento y Productos sanitarios, http://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/28262/Prospecto_28262.html.
- 132- National Center for Biotechnology Information. (2019) PubChem Database. Nystatin-VQOXZBDY SJBXMA-QEKUPDCNSA-N, CID=16219709, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16219709>.
- 133- National Inventors' Hall of Fame. (1994) Nystatin and the method of producing it: Elizabeth Lee Hazen and Rachel Brown biographies.
- 134- Niimi, M., Firth, N., Cannon, R. (2010) Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*; 98: 15-25.
- 135- Ng, KP., Kuan, CS., Kaur, H., Na, SL., Atiya, N., Velayuthan, RD. (2015). *Candida* species epidemiology 2000-2013: a laboratory-based report. *Trop Med Int Health*; 20(11):1447-1453.
- 136- Noble, SM., Gianetti, BA., Witchley, JN. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol.*; 15(2):96-108).
- 137- Nokhodchi, A., Talari, R., Valizadeh, H., Jalali, MB. (2007) An investigation on the solid dispersions of chlordiazepoxide. *International Journal of Biomedical Science*; 3(3):210-216.
- 138- Normand, S.; François, B., Dardé, M.L., Bouteille, B., Bonnivard, M., Preux, PM., Gastinne, H., Vignon, P. (2005) Oral nystatin prophylaxis of *Candida* spp. colonization in ventilated critically ill patients, *Intensive Care Med*; 31:1508–1513.
- 139- Nowak, M., Kurnatowski, P. (2009) Biofilm caused by fungistrukture, quorum sensing, morphogenetic changes, resistance to drugs. *Wiad Parazytol*; 55(1):19-25.
- 140- Ou, HT., Lee, TY., Chen, YC., Charbonneau, C. (2017) Pharmacoeconomic analysis of antifungal therapy for primary treatment of invasive candidiasis caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. *BMC Infect Dis*; 17(1):481.

- 141- Ouyang, D., Smith, SC. (2015) Computational Pharmaceutics: Application of Molecular Modeling in Drug Delivery. John Wiley & Sons; New Jersey, USA.
- 142- Palmeiro-Roldán, R., Fonseca-Berzal, C., Gómez-Barrio, A., Arán, VJ., Escario, JA., Torrado-Durán, S., Torrado-Santiago, S. (2014) Development of novel benzimidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. International Journal of Pharmaceutics; 472(1-2): 110-117.
- 143- Papadimitriou, E., Efentakis, M., Choulis, NH. (1992) Evaluation of maltodextrins as excipients for direct compression tablets and their influence on the rate of dissolution. Int J Pharm; 86: 131–136.
- 144- Pappas, PG., Kauffman, CA., Andes, D., Benjamin, DK Jr., Calandra, TF., Edwards, JE Jr. (2009) Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis; 48:503-35.
- 145- Pardi, G., Cardozo, E I (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontológica Venezolana. Vol. 40, nº 1.
- 146- Paredes, K., Pastor, FJ., Capilla, J., Sutton, DA., Mayayo, E., Fothergill, AW., Guarro, J. (2015). Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between in vitro antifungal pharmacodynamics and outcome. Rev Iberoam Mic ol; 32(1):34-9.
- 147- Park, JB., Prodduturi, S., Morott, J., Kulkarni, VI., Jacob, MR., Khan, SI., Stodghill, SP., Repka, MA. (2015) Development of an antifungal denture adhesive film for oral candidiasis utilizing hot melt extrusion technology. Expert Opin Drug Deliv; 12(1):1-13.
- 148- Patel, VF., Liu, F., Brown, MB. (2011) Advances in oral transmucosal drug delivery. J Control Release; 153(2):106-16.
- 149- Paula, SB., Morey, AT., Santos, JP., Santos, PM., Gameiro, DG., Kerbauy, G., Sena, EM., Ueda, LT., Carneiro, M., Pinge-Filho, P., Yamauchi, LM., Yamada-Ogatta, SF. (2015) Oral *Candida* colonization in HIV-infected patients

in Londrina-PR, Brazil: antifungal susceptibility and virulence factors. J Infect Dev Ctries; 9(12):1350-9.

150- Pemán, J., Salavert, M. (2013) Epidemiology and prevention of nosocomial invasive infections by filamentous fungi and yeasts. Enferm Infecc Microbiol Clin; 31(5):328-41.

151- Pfaller, MA., Diekema, DJ. (2007) Epidemiology of Invasive Candidiasis: a persistent public health problem. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 20(1): 133-163.

152- Prieto Santa Anna, LM., Díaz Suárez, LA., Illnait Zaragozí, MT., Perurena Lancha, MR., Cantelar de Francisco, N., Fernández Andreu, CM., Martínez Machín, G. (2010) Susceptibilidad a la nistatina de aislamientos bucales de *Candida* y su correlación con la respuesta al tratamiento. Rev Cubana Med Trop; v.62 n° 3.

153- Puerto, JL., García-Martos, P., Márquez, A., García-Agudo, L., Mira, J. (2001) Candidiasis orofaríngea; Rev Diagn Biol; vol.50 n° 4.

154- Pupe, CG., Villardi, M., Rodrigues, CR., Rocha, HV., Maia, LC., de Sousa, VP., Cabral, LM. (2011) Preparation and evaluation of antimicrobial activity of nanosystems for the control of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Int J Nanomedicine; 6: 2581–2590.

155- Queiroz, PA., Godoy, JS., Mendonça, P de S., Pedroso, RB., Svidzinski, TI., Negri, M. (2015) Adhesion and biofilm formation in artificial saliva and susceptibility of yeasts isolated from chronic kidney patients undergoing haemodialysis. J Med Microbiol; 64(9):960-6.

156- Quindós, G., Ribacoba, L., Contreras, I., Aguirre, JM. (1996) Tratamiento de las candidiasis orofaríngeas. Rev Iberoam Micol; 13 (supl): 11-15.

157- Quindós, G., Villar-Vidal, M., Eraso, E. (2009) Actividad de la micafungina contra las biopelículas de *Candida*. Rev. Iberoam. Micol; 26, 49–55.

158- Raad, I., Mohamed, J., Reitzel, R., Jiang, Y., Dvorak, T., Ghannoum, M., Hachem, R., Chaftar, A. (2011) The prevention of biofilm colonization by

multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes, *Biomaterials* 32: 2689-2694.

159- Ramage, G., Saville, SP., Thomas, DP., López-Ribot, JL. (2005) *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*; 4:633–8.

160- Rangel-Yagui, CD., Pessoa, A., Tavares, LC. (2005) Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 8(2):147–163.

161- Rasmussen, TB., Givskov, M. (2006) Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology*; 152(Pt 4):895-904.

162- Remington, JP., Gennaro, AR. (2000) Remington: The science and practice of pharmacy, 20th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md, USA.

163- Rinaudi, LV., Gonzalez, JE. (2009) The low-molecular-weight fraction of the exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *J Bacteriol*; 191(23): 7216–7224.

164- Rindum, JL., Stenderup, A., Holmstrup, P. (1994) Identification of *Candida albicans* types related to healthy and pathological oral mucosa. *J. Oral Pathol Med.*; 23: 406-12.

165- Rodríguez Cabrera, M., González Fernández, P., Bayolo Guanche, J.V., Barrera Padrón, Z. (2005) Caracterización Preliminar del Desoxicolato de Sodio de los Proveedores Merck y Fluka; *Revista CENIC Ciencias Químicas*; vol. 36, nº especial.

166- Rodríguez Ortega, J., Miranda Tarragó, J., Morejón Lugones, H., Santana Garay, JC. (2002) Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica; *Rev Cubana Estomatol*; v.39 nº 2.

167- Rood, J., Nawzad, H., Kalicharan, R., van Steenberg, M., Vromans, H. (2015) Drug release from an oromucosal paste for the selective decontamination of the oropharynx (in ICU patients and healthy volunteers). *Eur J Pharm Sci.*; 73:88-92.

168- Rosen, MJ. y Kunjappu, JT. (2012). *Surfactants and Interfacial Phenomena* (4th edition). Hoboken, John Wiley & Sons; New Jersey, USA.

- 169- Royal Society of Chemistry. (2013) The Merck Index; 15 Ed. Whitehouse Station NL, USA.
- 170- Rowe, R., Shesky, P., Quinn, M. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth edition, Pharmaceutical Press.
- 171- Saharan, VA., Kukkar, V., Kataria, M., Gera, M., Choudhury, P. (2009) Dissolution enhancement of drugs. *Int J Health Res*; 2(2):107-124.
- 172- Sardi, JC., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, AM., Mendes Giannini, MJ. (2013) *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*; 62(Pt 1):10-24.
- 173- Schaffner, CP. (1984) Polyene macrolides in clinical practice: pharmacology and adverse and other effects. *In* Omura, S., *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology, and Practice*. Academic Press, New York, USA; 457–507.
- 174- Sedeño, EP. (2012) Rachel Fuller Brown. SEBBM Divulgación: galería de retratos, women in biochemistry.
- 175- Sekiguchi, K. y Obi, N. (1961) Studies on absorptions of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and ordinary sulfathiazole in man. *Chem Pharm Bull*; 9:866–72.
- 176- Servicio Riojano de Salud. (2008) Precauciones de aislamiento en centros sanitarios.
- 177- Shah, N., Iyer, RM;., Mair, HJ., Choi, DS., Tian, H., Diodone, R., Fähnrich, K., Pabst-Ravot, A., Tang, K., Scheubel, E., Grippo, JF., Moreira, SA., Go, Z., Mouskountakis, J., Louie, T., Ibrahim, PN., Sandhu, H., Rubia, L., Chokshi, H., Singhal, D., Malick, W. (2013) Improved human bioavailability of vermurafeinib, a practically insoluble drug, using an amorphous polymer-stabilized solid dispersion prepared by a solvent-controlled coprecipitation process. *J Pharm Sci*; 102: 967-981.
- 178- Silva, FC., Marto, JM., Salgado, A., Machado, P., Silva, AN., Almeida, AJ. (2017) Nystatin and lidocaine pastilles for the local treatment of oral mucositis. *Pharm Dev Technol*; 22(2):266-274.

- 179- Silva, L., Coutinho, A., Fedorov, A., Prieto, M. (2003) Conformation and self-assembly of a nystatin nitrobenzoxadiazole derivative in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*; vol. 1617, (1–2): 69–79.
- 180- Skerman, VBD., McGowan, V., Sneath, PHA. (1980) Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol*; 30:225–420.
- 181- Strickley, RG. (2004) Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res*; 21(2): 201–230.
- 182- Suleyman, G., Alangaden, GJ. (2016). Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*; 30 (4):1023–1052.
- 183- Sultana, ST., Call, DR., Beyenal, H. (2016) Maltodextrin enhances biofilm elimination by electrochemical scaffold. *Sci Rep*; 6:36003.
- 184- Symecko, CW., Romero, AJ., Rhodes, CT. (1993) Comparative evaluation of two pharmaceutical binders in the wet granulation of hydrochlorothiazide: Lycatab DSH vs Kollidon 30. *Drug Dev Ind Pharm*; 19: 1131–1141.
- 185- Tachibana, T., Nakamura, A. (1965) A methode for preparing an aqueous colloidal dispersion of organic materials by using water-soluble polymers: dispersion of β -carotene by polyvinylpyrrolidone. *Colloid and Polymer Science*; 203(2):130–133.
- 186- Tallury, P., Randall, MK., Thaw, KL., Preisser, JS., Kalachandra, S. (2007) Effects of solubilizing surfactants and loading of antiviral, antimicrobial, and antifungal drugs on their release rates from ethylene vinyl acetate copolymer. *Dent Mater*; 23(8): 10.1016.
- 187- Talukder, R., Reed, C., Dürig, T., Hussain, M. (2011) Dissolution and solid-state characterization of poorly water-soluble drugs in the presence of a hydrophilic carrier. *AAPS PharmSciTech*; 12(4):1227–33.
- 188- Tambunlertchai, S., Srisang, S., Nasongkla, N. (2017) Development of antimicrobial coating by later-by-layer dip coating of chlorhexidine-loaded micelles. *J Mater Sci Mater Med*; 28(6):90.

- 189- Tang, X., Pikal, MJ. (2004) Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res*; 21(2):191-200.
- 190- Tayyab Ansari, M., Arshad, MS., Hussain, A., Ahmad, Z. (2018) Improvement of solubility, dissolution and stability profile of artemether solid dispersions and self emulsified solid dispersions by solvent evaporation method. *Pharm Dev Technol.*; 23(10):1007-1015.
- 191- Thakkar, F., Soni, T., Gohel, M., Gandhi, T. (2009) Supercritical fluid technology: a promising approach to enhance the drug solubility. *J Pharm Sci Res*; 1:1-14.
- 192- Thayer, AM. (2010) Finding solutions. *Chem Eng News*; 88:13–8.
- 193- Thiry, J., Lebrun, P., Vinassa, C., Adam, M., Netchacovitch, L., Ziemons, E., Hubert, P., Krier, F., Evrard, B. (2016) Continuous production of itraconazole-based solid dispersions by hot melt extrusion: Preformulation, optimization and design space determination. *Int J Pharm*; 515(1-2):114-124.
- 194- Thomas, DC., Christian, SD. (1980) Micellar and surface behavior of sodium deoxycholate characterized by surface tension and ellipsometric methods. *Journal of Colloid and Interface Science*; vol. 78 (2): 466-478.
- 195- Thomson/Micromedex. (2006) Drug Information for the Health Care Professional. Volume 1, Greenwood Village, CO; p. 2225.
- 196- Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., Graninger, W., Presterl, E. (2010) *In vitro* activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms, *J Antimicrob Chemother*; 65: 271–274.
- 197- Troillet, N., Durussel, C., Bille, J., Glauser, MP., Chave, JP. (1993) Correlation between in vitro susceptibility of *Candida albicans* and fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 12: 911-915.
- 198- Tumbarello, M., Posteraro, B., Trecarchi, E. M., Fiori, B., Rossi, M., Porta, R., Gaerano Donati, K., La Sorda, M., Spanau, T., Fadda, G., Cauda, R., Sanguinetti, M. (2007) Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*; 1843-1850.

- 199- Valentín, A., Cantón, E., Pemán, J. Quindós, G. (2007) Actividad *in vitro* de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Rev. Iberoam. Micol; 24: 272-277.
- 200- Vallabhaneni, S., Mody, RK., Walker, T., Chiller, T. (2016) The global burden of fungal diseases. Infect Dis Clin North Am; 30(1):1-11.
- 201- Vázquez, J., Sobel, J. (2002) Mucosal candidiasis. Infect Dis Clin North Am; 16: 793-820.
- 202- Vázquez Martínez, D. (1971) Mecanismo molecular de acción, selectividad y toxicidad de antibióticos usados en terapéutica. Publicaciones del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Asturias. Oviedo, España.
- 203- Uppuluri, P., Dinakaran, H., Thomas, DP., Chaturvedi, AK., Lopez-Ribot, JL. (2009) Characteristics of *Candida albicans* biofilms grown in a synthetic urine medium. J. Clin. Microbiol; 47, 4078–4083.
- 204- Uppuluri, P., Lopez-Ribot, J.L. (2010) An easy and economical in vitro method for the formation of *Candida albicans* biofilms under continuous conditions of flow. Virulence 1, 483–487.
- 205- Vadlapatla, R., Fifer, EK., Kim, CJ., Alexander, KS. (2009) Drug-organic electrolyte complexes as controlled release systems. Drug Dev Ind Pharm; 35(1):1-11.
- 206- Valentín, A., Cantón, E., Pemán, J., Quindós, G. (2007) Actividad *in vitro* de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Rev. Iberoam. Micol; 24: 272-277.
- 207- Vasconcelos, T., Sarmiento, B., Costa, P. (2007) Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. Drug Discov Today; 12(23-24):1068-75.
- 208- Venkatesh, M., Rong, L., Raad, I., Versalovic, L. (2009) Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. Journal of Medical Microbiology; 58: 936-944.
- 209- Vippagunta, SR., Maul, KA., Tallavajhala, S., Grant, DJ. (2002) Solid-state characterization of nifedipine solid dispersions. Int J Pharm; 236(1-2):111-23.

- 210- Vippagunta, SR., Wang, Z., Hornung, S., Krill, SL. (2007) Factors Affecting the Formation of Eutectic Solid Dispersions and Their Dissolution Behavior; Journal of Pharmaceutical Sciences; vol. 96 (2): 294-304.
- 211- Vo, CL., Park, C., Lee, BJ. (2013) Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. Eur J Pharm Biopharm; 85(3 Pt B):799-813.
- 212- Webb, BC., Thomas, CJ., Willcox, MDP., Harty, DWS., Knox, KW. (1998). *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of candida species in oral cavity. Austral. Dent J; 43 (1): 45-50.
- 213- Xu, LC., Siedleck, CA. (2011) Submicron-textured biomaterial surface reduces staphylococcal bacterial adhesion and biofilm formation, Acta Biomaterialia; 8(1):72-81.
- 214- Yehia, MA., El-Ammawi, TS., Al-Mazidi, KM., Abu El-Ela, MA., Al-Ajmi, HS., (2010) The spectrum of fungal infections with a special reference to dermatophytoses in the capital area of Kuwait 2000-2005: a retrospective analysis. Mycopathologia; 169 (4): 241-246.
- 215- Yehia, SA., El-Gazayerly, ON., Basalious, EB. (2008) Design and *in vitro/in vivo* evaluation of novel mucoadhesive buccal discs of an antifungal drug: relationship between swelling, erosion, and drug release. AAPS PharmSciTech; 9(4):1207-17.
- 216- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K. (1988) *Salmonella* mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. Environ. Mol. Mutagen; Suppl 12; 1-158.

X.ANEXO

ORIGINAL ARTICLES

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain

Nystatin antifungal micellar systems on endotracheal tubes: development, characterization and *in vitro* evaluation

C. BENAVENT*, V. GARCÍA-HERRERO, C. TORRADO, S. TORRADO-SANTIAGO

Received July 24, 2018, accepted November 10, 2018

*Corresponding author: Carlos Benavent, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain
carlosbenavent@ucm.es

Pharmazie 74: 34–38 (2019)

doi: 10.1691/ph.2019.8138

Decontamination of patients' clinical devices in intensive care units is generally performed with an antifungal suspension. Nystatin is a widely-used high spectrum antifungal due to its low systemic absorption. However, nystatin has high hydrophobicity which hinders the contact with the internal lumen of the devices. In this work, hydrophilic micellar systems of nystatin were developed with sodium deoxycholate on silicone endotracheal tubes. The physical characteristics of the micellar system at different nystatin:deoxycholate ratios were studied using scanning electron microscopy, X-ray powder diffraction and differential scanning calorimetry. The electron microscopy results reveal that the deoxycholate micellar system altered the surface morphology, and the size of the aggregates was observed to be smaller. The hydrophilic structures of deoxycholate produce systems with a high surface area containing nystatin molecules on their interior. The X-ray and differential scanning calorimetry assays revealed a typical change in the crystallinity of micellar systems when the deoxycholate proportion increases. The endothermic peak of nystatin was not observed in the micellar systems as a consequence of the reduced crystallinity. Nystatin was homogeneously dispersed in the surfactant matrix. Micellar systems with 1:0.8 nystatin:deoxycholate ratio (MS-N:DC [1:0.8]) showed increased antifungal activity compared to nystatin raw material. Micellar systems also achieved an over 40% inhibition of *Candida albicans* biofilm formation. The results obtained in this study conclude that the higher hydrophilic characteristic of the surfactant deoxycholate enhances nystatin penetration into the surface of the endotracheal tubes.

1. Introduction

Fungal infections by *Candida* species, mainly *C. albicans*, are considered a major public health issue (Ng et al. 2015). *C. albicans* biofilm formation (Uppuluri et al. 2009) on clinical devices enhances its pathogenic capacity, as it increases resistance to immune-mediated defences (Mayer et al. 2013) and reduces susceptibility to antifungal drugs (Tobudic et al. 2012; Desai and Mitchell 2015). Despite the dominance of *C. albicans*, other emergent species associated to biofilm formation should also be considered (Leite de Andrade et al. 2017; Marcos-Zambrano et al. 2017; Paredes et al. 2015).

Patients in intensive care units are generally treated with antifungal suspensions to ensure the decontamination of the devices. The accurate detection of contaminated devices (Martin-Rabadán et al. 2017) is an essential factor for guaranteeing effective treatment. Several drugs have been described as potentially useful for preventing *C. albicans* biofilm formation (Yuang et al. 2012; Chandra and Ghanoum 2017), even against resistant strains (Melkusová et al. 2004).

An anti-biofilm effect using surfactants in chlorhexidine micellar systems resulted in the enhanced wettability of the silicone surface of the material, which reduces biofilm formation for a longer period compared with chlorhexidine raw material (Tambunlertchai et al. 2017). Several micellar systems with hydrophilic carriers have also demonstrated an increased anti-biofilm and antifungal effect (Abu Hashim et al. 2015). Surfactants such as sodium dodecyl sulphate and cremophor show an anionic behaviour which promotes absorption in the membranes and enhances its antibiotic or antifungal action from inside the micellar system (Li et al. 2010). Amphotericin B (AmB) was commercialized as a dimeric form in a micellar system of sodium deoxycholate (DC), but showed

toxicity (Gangadhar et al. 2014). New formulations such as lipid micellar systems and liposomes have subsequently been developed (López-Sánchez et al. 2018). Nystatin (Nyst) has the advantage of being a spread spectrum antifungal that is easily accessible by hospital pharmacy services and has very few toxic effects due to the lack of systemic absorption. Nyst's high hydrophobic features imply less contact with the internal surface of silicone devices.

This work studies the formulation and characterization of Nyst micellar systems with DC. The effect of micellar systems on Nyst crystallinity, wettability and aqueous solubility was assessed using scanning electron microscopy (SEM), X-ray powder diffraction (XRPD) and diffraction scanning calorimetry (DSC) techniques. *In vitro* assays were done on silicone clinical devices to assess the antifungal and anti-biofilm effect of these micellar systems.

2. Investigations, research and discussion

2.1. Preparation of formulations

Aqueous suspension: a yellow coloured suspension was obtained. Nyst raw material precipitates rapidly and accumulates at the bottom of the tubes. Precipitated Nyst could be easily resuspended by manual agitation.

Physical mixture: the mixture of Nyst and DC produced a light yellow powder which occupied a greater volume than the Nyst raw material. The physical mixture remains in suspension for longer: the first precipitations did not appear until 10 min after being suspended.

Micellar system: the solubility of slightly water-soluble drugs can be increased through the addition of surfactants (Rangel-Yagui et al. 2005); we therefore designed a micellar system with DC as an anionic surfactant. This natural surfactant obtained from bile